

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

***Arquitectura molecular de un complejo MCM
helicasa-primasa***

Tesis doctoral

June Sanchez Berrondo

Madrid, 2011

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



***Arquitectura molecular de un complejo MCM
helicasa-primasa***

Memoria que presenta la licenciada en Farmacia June Sanchez
Berrondo para optar al grado de Doctora por la Universidad
Autónoma de Madrid

Director de Tesis: Dr. Guillermo Montoya Blanco
Codirectora de Tesis: Dra. Jasminka Bošković

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas



GUILLERMO MONTOYA BLANCO, jefe de grupo de Cristalografía de Macromoléculas del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

JASMINKA BOŠKOVIĆ, investigadora del grupo de Cristalografía de Macromoléculas del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

SEBASTIÁN CERDÁN, Profesor Honorario del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICA QUE:

JUNE SANCHEZ BERRONDO, licenciada en Farmacia, ha realizado bajo nuestra dirección y codirección, respectivamente, en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas el trabajo “Arquitectura molecular de un complejo MCM helicasa-primasa”.

Consideramos satisfactorio el trabajo realizado y apto para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente Certificado en Madrid, a 10 de Diciembre de 2010.

Director,

Guillermo Montoya

Codirectora,

Jasminka Bošković

Tutor,

Sebastián Cerdán

Esta tesis ha sido realizada gracias al disfrute de una beca predoctoral denominada “beca para la formación y perfeccionamiento de personal investigador” de modalidad AE financiado por el Gobierno Vasco.

Agradecimientos

¿Por dónde empezar? Son tantas las cosas y a las personas que tengo que agradecer el haber llegado hasta aquí.... Primero, quiero agradecer a mi director de tesis Guillermo Montoya, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el laboratorio, y por todo lo que me ha enseñado. Estos cuatro años y poco, me han permitido profundizar y aprender sobre la bioquímica y biología estructural.

Tengo mucho que agradecer a la codirectora de esta tesis, Jasminka Bošković, que tanto me ha aguantado y me ha ayudado. Estoy segurísima que sin su ayuda nunca hubiera podido sacar las cosas adelante, ni finalizar esta tesis. Todo lo que he aprendido sobre el maravilloso mundo de la microscopía electrónica se lo debo a ella. Eskerrik asko Jaska, por preocuparte por mi durante estos años, y ayudarme en mi formación, tanto en el aspecto científico como en lo personal. Me ha encantado trabajar contigo y conseguir a base de sudor los resultados obtenidos. Vales un montón, como jefa y como amiga.

Esta tesis no hubiera sido lo mismo sin los magníficos compañeros que he tenido en el laboratorio. Gracias a todos por vuestra ayuda y compañía, tanto dentro del laboratorio como fuera de él, por esos momentos de risas y alegrías, así como el apoyo incondicional que siempre me habéis demostrado todos. Son muchas personas las que han pasado por este laboratorio durante mi estancia predoctoral. Bego, a la que conocí en mi estancia como alumna durante la beca de verano y que lamentablemente se marchó antes de mi incorporación. Gracias por tu ternura y ayuda, durante los dos meses de verano, eres tan buena científica como madraza. Berni, con el que tanto me reído siempre, nada hubiera sido igual sin tus chistes y festivales del humor. David, que vino para unos pocos meses al laboratorio y ya estaba cuando me incorporé. Nunca se me olvidarán tus clases sobre la correcta utilización del pHmetro, ha sido un verdadero placer haberte conocido y compartir los momentos y celebraciones fuera del laboratorio. Javi, mi primer jefe aun siendo estudiante predoctoral, que tanto me ha ayudado y me ha calmado en mis momentos de “crisis”. A ti te debo muchos protocolos y mucha parte de lo que he aprendido durante estos años. Eres una de las personas más tranquilas y serenas que conozco, siempre dispuesto a ayudar cuando se te necesita. Gracias por todo Rey, aunque una cosa te tengo que decir: “Se dice ARRASCAR y no RASCAR”. Simone, mi queridísimo Saimonete, con el que he compartido cursos de doctorado, de cristalografía y momentos de tristezas y alegrías. Te echo muchos de menos, y

que sepas que el laboratorio no es lo mismo sin tus emails y comentarios. Sonia, ¿qué puedo decir de la organizadora oficial del laboratorio? Pues que me ha encantado conocerte, que eres un sol de persona y que te mereces lo mejor. No cambies nunca, porque ya quedan pocas personas como tú. Juanito, mi Jontxu y fiel amigo, siempre alegrando los momentos más difíciles dentro del laboratorio y fuera de él. Eres único y por eso te quiero tanto. Mariajo, madre primeriza, con la que tantos momentos mañaneros he compartido. Nunca olvidaré todos tus consejos y la ayuda incondicional que me has prestado durante estos años. Te deseo lo mejor en tu nueva vida. Pilar, persona muy trabajadora y siempre dispuesta a ayudar. Tantas cosas tengo para agradecerte que no sé por dónde empezar. A ti te debo todos los esfuerzos realizados y todo lo que he aprendido del mundo de la cristalización. Eres una de las personas más eficientes que conozco. Jesus, persona silenciosa pero que siempre tiene una palabra adecuada en el momento adecuado. Junto a mí, el primero en poner en marcha el laboratorio a primer hora de la mañana. Nehar, you are my “mini YO”. I will never forget your help with my English, and the moments we share together. Suni, who is always smiling and helps whenever you need. It was a pleasure to meet you. I wish you the best in U.S. Pablo, trabajador nato, del cual he podido aprender muchas cosas, gracias por tu enseñanza y ayuda durante este proyecto. Lissy, persona indispensable en el laboratorio, sin cuya presencia todo sería un caos. Inés, cuya ayuda tengo que agradecer en el área de la cristalografía. Marco, consejero y compañero de fines de semana en el laboratorio. Anita, te deseo lo mejor en los años que te quedan de la tesis doctoral. Desde un principio has demostrado tu potencial como científica y como persona. Muchas gracias por tantos “papers” que has tenido que mandarme para que pudiera escribir esta tesis. Jaime, deportista nato y competente, mucho ánimo con tu tesis doctoral.

Fuera del laboratorio de cristalografía de macromoléculas, hay muchas personas del CNIO a las que tengo mucho que agradecer. Marco y Ramón, de la Unidad de Espectroscopía, sin cuya ayuda parte de esta tesis no hubiera sido posible. Gracias Marco, por tu compañía y ayuda en muchos experimentos biofísicos. También tengo que mencionar a los otros dos laboratorios de cristalografía recién iniciados, bajo el mando de Daniel y Santiago, a los que deseo lo mejor. Gracias por vuestro apoyo y ayuda, ha sido un placer conocerlos y verlos nacer. Dentro del programa de biología estructural, tengo que mencionar a dos personas que para mí siempre serán como Zipi y Zape: Edu y Angel, que casualmente siempre los veo merodeando por nuestro laboratorio los jueves. ¿Por qué será? ejem. Angel, aun tenemos un salto pendiente.

Es indispensable que dé las gracias a los miembros de “casi” mi segundo lugar de trabajo: los laboratorios de Juan Mendez y Ana Losada. Gracias por vuestra ayuda y generosidad. No puedo dejar de mencionar a Arkaitz, que aun siendo bilbaíno, siempre será mi “xurri”. Te debo mucho, tú me iniciaste en el mucho de las “helicasas”.

Fuera del CNIO, queda mucha gente a la que debo el haber llegado hasta aquí. Para empezar, nada hubiera sido lo mismo sin la gente con la que he compartido este viaje a los “madriles”: Rubén, Sergio, Sandra y Bea. Nuestro viaje empezó con aquella beca de verano, y con el primer año de tesis que compartimos. Desde siempre hemos sido una piña, como una mini familia y aunque con los años por distintas razones nos hemos distanciado, sé que nunca olvidaré los momentos que hemos compartido. Gracias AMIGOS. También, debo mucho a toda la gente que he conocido durante mis años en Madrid. Toda esa gente del norte, y los que casi lo parecen, que siempre se han preocupado por mí y me han apoyado, confiando en mi capacidad: va por vosotros pamplonicas y Guipuzcoanos: Leire, Germán, Arzin, Javier, Mikel, Pikatxu y por supuesto, las dos madrileñas adoptadas, Bea y Cris. Gracias por todo, conoceros me ha cambiado la vida, y sé que cuando se acabe mi estancia en Madrid os echaré mucho de menos. Sois los mejores.

Por supuesto, no me puedo olvidar de mis queridas compañeras de deporte: Martita, Rocío “amor”, Gema, Sonia y Elena. Mis vecinas en mi nuevo hogar, que aunque las he conocido en esta última etapa de la tesis, es como si llevará años junto a ellas. En poco tiempo, os habéis convertido en mis amigas, compañeras de risas y alegrías. Los días de duro trabajo de escritura no hubieran sido iguales sin las escapadas casi nocturnas corriendo en el parque junto a los perros. Os quiero mucho chicas, y en este momento parte de la razón por la que no quisiera irme sois vosotras. Roci, mi “Pili”, buena persona y amiga incondicional, siempre me entiendes a la perfección, sabes que te quiero un montón, que cuando me vaya te echaré muchísimo de menos y que siempre tendrás una amiga en el norte para lo que sea, ¿quién me va a tranquilizar ahora? Gemita, eres un amor y vales un montón, ya lo sabes, siempre dispuesta a ayudar. Ele, todo eficacia, que habría sido de mi sin tus puntuaciones en la escritura, ya sabes dónde estoy para lo que quieras. Soni, valiente y decidida como nadie, me encanta reírme contigo, siempre dispuesta a meternos caña en el gimnasio, “culito –culito”. ¡No cambiéis nunca!

No puedo olvidarme de las personas que siempre están a mi lado, con las que tanto he compartido durante mis años de carrera y que a pesar de la distancia en estos años de tesis, siempre han estado y están a mi lado. Mila esker denagatik Saio eta Bego. Benetan inoiz

aurkituko ditudan lagunik hoberenak zeratela. Badakizue asko maite zaituztedala, ta niretzat nire ahizpak izango bazinate bezela zaretela. Ziur nago elkarrengandik hurrun egon harren, elkartutakoan denbora pasa ez balitz bezela egongo gerala beti. Maite zaituztet “mis niñas”.

Aun me queda agradecer a toda mi familia su apoyo incondicional. Mis tíos y padrinos, Javi e Itziar. Inoiz aukeratzerik izango banu, ez dudik izan zuek hautatuko zintuztedala nire izeba ta osaba bezela. Beti zaudete behar zaituztedanean, laguntzeko prest. Mila esker, maite zaituztet. Ta noski, nere lengusuak, Oier,izaro, Iker, Eva, Amaia..... ttikitatik elkarrekin egon gara benetako kuadrila bat bezela. Beti izan naiz txikiena, baina beti nigatik arduratu zarete. Azkeneko urte hauetan edade diferentzia desagertu da ta inoiz baino gertuo sentitzen naiz zuengandik. Juerga ta bidai ugari geratzen zaizkigu elkarrekin. Maite zaituztet.

Las personas que siempre están a mi lado, a los que debo lo que soy, los que han hecho posible todo en mi vida: aita eta ama. Zuei zor dizuet dena, nire bizitza osoa. Beti zaudete behar zaituztedanean, nere bizitzako pertsonarik garrantzitzuenak zarete. Mila esker denagatik. Zuen laguntza eta pazientziarik gabe ezin izango nuke lortu ezer bizitza honetan. Asko maite zaituztet.

No puedo dejar de mencionar a alguien muy especial: Mura. Siempre traviesa y curiosa, con mal genio cuando no consigue lo que quiere, pero mimosa y cariñosa cuando estoy recién levantada. Sé que te encantan mis apuntes y que te duermes sobre ellos para hacerme compañía. Gracias GORDI. Y por supuesto agradecer a Arzin, su compañía, su acogida en el hogar y su humor característico, eres único. Muchas gracias compí.

Por último, pero no por ello menos importante, tengo que dar las gracias a la persona que tanto me ha apoyado estos dos últimos años. La persona que más me ha aguantado en los momentos bajos y críticos. El conocerte ha sido una de las mejores cosas que me ha pasado en mi vida. Gracias por todo, por acogirme en tu casa y compartir conmigo estos meses de encerramiento. Por aguantar mis estreses y crisis, por saber siempre como animarme y hacerme sonreír. Siempre has confiado en mí y me has apoyado. Te debo mucho, y nunca sabré como agradecerte todo. Estos dos años, a pesar de los momentos bajos, han sido insuperables. Te quiero muchísimo y sé que sin ti no habría conseguido llegar hasta aquí. Eskerrik asko Iñaki.

Resumen

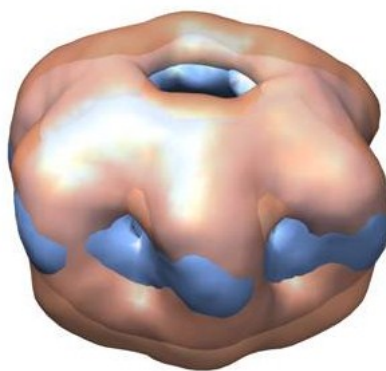
La replicación de ADN es un proceso esencial en organismos eucariotas y procariotas. Este proceso es indispensable para la división y proliferación celular, por lo que está estrictamente regulado a través de una secuencia de etapas en las que participan numerosas proteínas y complejos protéicos. Entre las proteínas implicadas se encuentran las enzimas helicasas y primasas. Las helicasas catalizan la separación de las dos hebras del ADN en una reacción dependiente de la hidrólisis de ATP. Las primasas usan los fragmentos de ADN de cadena sencilla (ssADN), formados por la acción de la helicasa, para la síntesis de pequeños fragmentos de ARN denominados cebadores.

Se ha sugerido que las proteínas MCM son las principales candidatas para desempeñar el papel de helicasa replicativa en arqueas y en eucariotas. Su función es esencial tanto en la fase inicial como en la fase de elongación de la replicación de ADN. Las proteínas MCM forman complejos multiméricos. En eucariotas el complejo Mcm2-7 está formado por seis proteínas diferentes con homología secuencial entre ellas, que posiblemente comparten un ancestro común. En la búsqueda de homólogos de MCM por análisis de secuencias, se identificó un profago integrado en el genoma de *Bacillus cereus* que fue denominado BcMCM. La proteína BcMCM está compuesta por 1029 aminoácidos con dos dominios diferenciados. La parte N-terminal contiene una región homóloga a la subunidad catalítica de la ADN primasa eucariota y arquea. Mientras que la parte C-terminal contiene un dominio AAA+ ATPasa homólogo a las helicasas MCM, con los característicos dominios de unión a ATP: Walker A y Walker B. La proteína se purifica en su forma monomérica, sin embargo, es activa como complejo homohexamérico. El complejo BcMCM presenta forma de anillo hexamérico con una cavidad central y seis canales laterales, similares a las MCM de arqueas, eucariotas (Mcm2-7) y a la helicasa del virus SV40. La oligomerización de BcMCM es estimulada por la unión a nucleótidos. La presencia de ADN produce un cambio conformacional en el complejo y hace que el complejo sea más estable. Los estudios bioquímicos llevados a cabo han mostrado la interacción del monómero BcMCM con ssADN y ADN de doble cadena (dsADN), siendo mayor la afinidad por ssADN. La actividad ATPasa de BcMCM es dependiente de ssADN. La proteína es capaz de desenrollar la dsADN con polaridad 3'-5' en un proceso dependiente de ATP. Los monómeros de BcMCM son capaces de catalizar la síntesis de cebadores de ARN. El dominio helicasa, BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹, conserva la actividad helicasa pero con una menor capacidad de hidrolizar ATP que la proteína completa. Sin embargo, el dominio primasa, BcMCM¹⁻³⁶¹, por sí solo no muestra actividad primasa ni es capaz de interaccionar con ssADN.

Abstract

DNA replication is an essential process in both prokaryotic and eukaryotic organisms that is indispensable for cell division and proliferation. DNA replication is strictly regulated through a sequence of steps that involve many proteins and macromolecular protein complexes. Some of these proteins are DNA helicases and primases. The replicative helicases are enzymes that unwind a duplex form of DNA (dsDNA) by a process dependent on ATP hydrolysis. DNA primases use single stranded (ssDNA) product of helicase activity to synthesize short fragments of RNA called primers. These primers are used by polymerases to synthesize new DNA strands.

The MCM proteins have essential role in both initiation and elongation phases of DNA replication, being the best candidates for the replicative helicase in archaea and eukaryotes. They exist as multimeric complexes. Mcm2-7 eukaryotic complexes have six distinct subunits with sequence homology to one another that probably derived from a common ancestor. Sequence analysis methods have detected a MCM homolog in from of prophage within the genome of *Bacillus cereus* (BcMCM). This BcMCM protein has 1029 residues and contains two domains. The N-terminal section contains a region homologous to catalytic subunit of eukaryotic and archaeal DNA primases. The C-terminal section contains a region of AAA+ ATPase domain homologous to the MCM helicases with typical Walker A and Walker B motifs in the ATP binding site. BcMCM was purified as monomer, but it is active as homohexameric complex. BcMCM forms hexameric rings structure with a central cavity and six lateral channels, similar to those observed in archaeal MCM, eukaryotic Mcm2-7 complex and the helicase of SV40 virus. BcMCM oligomerization is stimulated by ATP binding and not by its hydrolysis. The DNA binding induces a conformational change in the complex that makes it more stable. Our biochemical studies have demonstrated the interaction of the monomeric form of BcMCM with ssDNA as well as dsDNA, presenting a higher affinity for ssDNA. BcMCM ATPase activity is ssDNA-stimulated and it unwinds double helix of DNA with 3'-5' polarity, in a process dependent on hydrolysis of ATP. BcMCM monomer catalyzes RNA primers synthesis. Although the BcMCM¹⁻³⁶¹ primase domain doesn't show primase activity neither the capacity to interact with ssDNA, the BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ helicase domain conserves all BcMCM full length functions having less ATPase and helicase activity.



Índice



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La replicación de ADN	3
1.1.1. Fase inicial de la replicación	4
1.1.1.1. Formación del complejo pre-Replicativo (pre-RC) en eucariotas	4
1.1.1.2. Complejo de pre-Iniciación (pre-IC) y activación de la replicación.....	5
1.1.2. Ensamblaje de los factores implicados en la fase de elongación.....	7
1.2. Helicasas replicativas.....	8
1.2.1. Características generales.....	8
1.2.2. DnaB la helicasa bacteriana	9
1.2.3. Las MCM.....	10
1.2.3.1. MCM en arqueas.....	10
1.2.3.2. Complejo Mcm2-7 eucariota	11
1.2.3.3. Estudios estructurales de las MCM.....	12
1.2.3.3.1. Análisis estructurales de las MCM eucariotas.....	12
1.2.3.3.2. Análisis estructural de las MCM arqueas	12
1.2.3.4. El centro catalítico de las proteínas AAA+ ATPasa	15
1.2.3.4.1. Importancia funcional de los distintos motivos del centro activo	16
1.2.4. El complejo CMG	17
1.3. DNA primasas	18
1.3.1. Primasas de procariotas	18
1.3.2. DNA primasas eucarióticas.....	19
1.3.3. Síntesis de los cebadores	19
1.3.4. La función de la helicasa en la síntesis del cebador	19
1.4. MCM en <i>Bacillus cereus</i> (BcMCM): un complejo MCM helicasa-primasa	20
1.4.1. Evolución de la maquinaria replicativa del ADN	21
1.4.2. La teoría “replicon takeover”	21
1.4.3. Características bioquímicas de BcMCM	22
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Clonaje y expresión de proteínas	29
3.1.1. BcMCM silvestre.....	29
3.1.2. Mutantes BcMCM	30
3.1.3. Dominio primasa de BcMCM (BcMCM ¹⁻³⁶¹)	30



3.1.4. Dominio helicasa de BcMCM (BcMCM ⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹).....	31
3.2. Purificación.....	31
3.2.1. BcMCM silvestre.....	31
3.2.2. Mutantes Walker A K653A, Walker B D711A y “dedo de Arginina” R782A.....	32
3.2.3. Dominio primasa BcMCM ¹⁻³⁶¹	32
3.2.4. Dominio helicasa BcMCM ⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹	33
3.3. Análisis del ADN co-purificado con la fracción BcMCM hexamérica	34
3.3.1. Estudio de la relación de absorbancia a 260 nm/280 nm.....	34
3.3.2. Dicroísmo circular (CD).....	35
3.3.3. Obtención del ADN co-purificado con el complejo hexamérico BcMCM	35
3.3.4. Caracterización del ADN co-purificado con el complejo BcMCM	35
3.3.4.1. Estudió del tamaño del ADN	35
3.3.4.2. Estudio de la naturaleza del ADN co-purificado	36
3.4. Caracterización biofísica.....	36
3.4.1. Ultracentrifugación analítica.....	36
3.4.2. Dicroísmo Circular	37
3.4.3. Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	37
3.5. Caracterización Bioquímica	37
3.5.1. Actividad ATPasa	37
3.5.2. Ensayos de unión a ADN.....	38
3.5.3. Actividad helicasa	39
3.5.4. Ensayo de actividad primasa	39
3.6. Hexamerización	40
3.6.1. Ensayo de hexamerización	40
3.6.2. Análisis de la hexamerización mediante cromatografía de gel filtración	40
3.6.3. Electroforesis en geles nativos.....	40
3.7. Microscopía electrónica	41
3.7.1. Purificación del complejo BcMCM y GST-BcMCM con ADN mediante bolas magnéticas	41
3.7.2. Complejos de BcMCM con ADN marcado con oro.....	42
3.7.3. Obtención de imágenes	43
3.7.5. Reconstrucción tridimensional (3D) de los complejos.....	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Clonaje, expresión y purificación de BcMCM recombinante	47
4.1.1. BcMCM recombinante es una proteína soluble y monomérica in vitro	47



4.1.2. La BcMCM recombinante forma hexámeros en presencia de ADN.....	49
4.1.3. Caracterización del ADN co-purificado con el hexámero	51
4.2. Caracterización biofísica de BcMCM	52
4.2.1. BcMCM es estable, monomérica, homogénea y monodispersa en solución	52
4.2.2. La BcMCM recombinante está plegada y presenta estructura secundaria y terciaria	53
4.3. Proteínas mutantes del centro catalítico AAA+ ATPasa.....	54
4.3.1. Subclonaje y expresión de los mutantes Walker A (K653A), Walker B (D711A) y “dedo de Arginina” (R782A).....	54
4.3.2. Purificación de los mutantes K653A, D711A y R782A.....	56
4.4. Subclonaje, expresión y purificación de los dominios primasa y helicasa aislados	57
4.4.1 El dominio primasa BcMCM ¹⁻³⁶¹	57
4.4.2. El dominio helicasa BcMCM ⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹	59
4.5. Caracterización bioquímica de BcMCM	60
4.5.1. BcMCM interacciona con ADN in vitro.....	60
4.5.1.1. BcMCM une con mayor afinidad el ssADN	60
4.5.1.2. BcMCM es capaz de unir ssADN de una longitud superior a 20 nucleótidos	61
4.5.1.3. Los mutantes del centro catalítico ATPasa no afectan la asociación con ssADN	62
4.5.2. Actividad ATPasa	63
4.5.2.1. La presencia de ssADN estimula la hidrólisis del ATP por BcMCM in vitro	64
4.5.2.2. Contribución de diferentes motivos a la actividad ATPasa	65
4.5.3. BcMCM es capaz de desenrollar el dsDNA.....	66
4.5.3.1. BcMCM separa la doble hélice de ADN con polaridad 3’-5’	66
4.5.3.2. Los mutantes de los motivos implicados en la actividad ATPasa afectan a la actividad helicasa de BcMCM desigualmente	68
4.5.4. Oligomerización de BcMCM	69
4.5.4.1. BcMCM forma complejos hexaméricos al asociarse a nucleótido en presencia de ciertos aniones.....	69
4.5.4.2. BcMCM es capaz de formar complejos hexaméricos en presencia de ADN in vitro	70
4.5.4.3. El ADN estabiliza el complejo homohexamérico de BcMCM.....	71
4.5.4.4. Oligomerización de los dominios aislados	73
4.5.5. BcMCM sintetiza cebadores independientemente de la oligomerización	73
4.5.6. Caracterización bioquímica del dominio helicasa BcMCM ⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹	75



4.5.6.1. El dominio BcMCM ⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ interacciona con ssADN	75
4.5.6.2. El dominio helicasa sin la presencia del dominio primasa posee actividad ATPasa.....	76
4.5.6.3. El dominio helicasa es capaz de separar la doble hélice de ADN	77
4.5.7. Caracterización bioquímica de GST-BcMCM	78
4.5.7.1. GST-BcMCM interacciona con ssADN	79
4.5.7.2. La adición de la etiqueta seis histidinas-GST afecta levemente a la hidrólisis ..	79
4.5.7.3. La presencia de la etiqueta seis histidinas-GST disminuye la actividad helicasa de BcMCM.....	80
4.6. Caracterización estructural del hexámero BcMCM mediante microscopía electrónica..	81
4.6.1. Complejo hexamérico BcMCM en presencia de los nucleótidos ATPγS y ADP	82
4.6.2. Complejo hexamérico de BcMCM asociado a ssADN	86
4.6.2.1. Purificación del hexámero BcMCM unido a ADN por medio de bolas magnéticas	86
4.6.2.2. Análisis 3D del complejo BcMCM con ATPγS y ssADN	87
4.6.3. Localización de los dominios helicasa y primasa en la estructura 3D de BcMCM	90
4.6.4. Marcaje con estreptavidina-oro de la molécula de ADN en el complejo BcMCM	92
5. DISCUSIÓN	95
5.1. La co-regulación primasa-helicasa	97
5.2. Estructura 3D del homohexámero BcMCM	99
5.2.1. Complejo BcMCM-ATPγS	100
5.2.2. Cambio conformacional estimulado por el ADN.....	100
5.2.3. Ensamblaje del complejo BcMCM sobre el ADN.....	103
5.3. Mecanismo de acción de BcMCM en la replicación.....	105
5.3.1. CMG como helicasa replicativa	105
5.3.2. BcMCM en la replicación.....	107
5.3.3. Síntesis de ADN en la replicación	108
5.3.3.1. BcMCM en la horquilla replicativa.....	109
6. CONCLUSIONES	113
7. BIBLIOGRAFÍA.....	117
APÉNDICE	131

Abreviaturas

AAA+ ATPasa: “ATPases Associated with various celular Activities”

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosina difosfato

ADP-AlF_x: adenosina difosfato fluoruro de aluminio

AMP-PNP: 5'-adenilil-β,γ-imidodifosfato

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosina trifosfato

ATPγS: adenosina 5'-(3-tiotrifosfato)

B. cereus: *Bacillus cereus*

BcMCM: MCM de *Bacillus cereus*

bp: pares de bases

BSA: seroalbumina bovina

CD: dicroísmo circular

CDK: quinasa dependiente de ciclinas

Ci: curio

CMG: Cdc45/Mcm2-7/GINS

C-terminal: extremo carboxilo terminal

CTD: dominio carboxilo terminal

CTP: citidina trifosfato

DDK: quinasa dependiente de Dbf-4

DLS: dispersión dinámica de la luz



dsADN: ADN de doble cadena

DTT: ditionitrosito

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EMAN: "Electron Micrograph ANalysis"

EMSA: ensayos de retardo en la movilidad electroforética

FSC: "Fourier Shell Correlation"

GST: glutatión-S-transferasa

GTP: guanina trifosfato

His: histidina

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

K_d: constante de disociación

kDa: kiloDalton

LDH: lactato deshidrogenasa

LTAg: "Large Tumor antigen"

LUCA: "Last Universal Celular Ancestor"

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

nt: nucleótido

N-terminal: extremo amino terminal

NTD: dominio amino terminal

MB: "MungBean"

MCM: "Mini Chromosome Maintenance"

MkaMCM: MCM de *Methanopyrus kandleri*

M. thermoautotrophicus: *Methanobacterium thermoautotrophicus*

MthMCM: MCM de *Methanobacterium thermoautotrophicus*

MW: peso molecular

OD: densidad óptica

ORC: "Origin Recognition Complex"

ORF: marco de lectura abierta

PCNA: "Proliferating Cell Nuclear Antigen"

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Pd: polidispersidad

PEI: polietileneimina

PEP: fosfoenolpiruvato

PK: piruvato quinasa

Pol: polimerasa

Poli (T): politimidínico

PONDR: "Predictor of Naturally Disorder Regions"

pre-IC: complejo de pre-iniciación

pre-LC: "pre-Loading Complex"

pre-RC: complejo pre- replicativo

RFC: "Replication Factor Complex"

RPA: "Replication Protein A"

RPC: "Replisome Progression Complex"

RPM: revoluciones por minuto

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*



SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en condiciones desnaturalizantes

s.e.m.: "standar error of mean" (error estándar de la media)

ssADN: ADN de cadena sencilla

S. solfataricus: *Sulfolobus solfataricus*

SsoMCM: MCM de *Sulfolobus solfataricus*

SV 40: virus de los simios 40

TBE: Tris-Borato-EDTA

TCEP: fosfato de tris (2-Ioroetil)

TEV: virus del jaspeado del tabaco

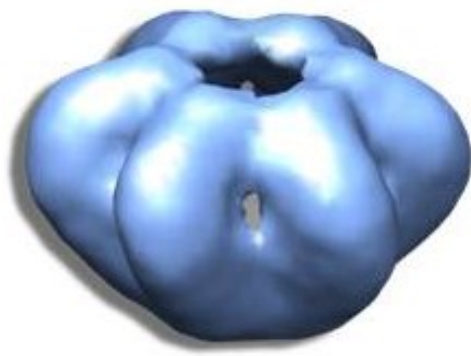
T_m: temperatura media

Tris: tris (hidroximetil) aminometano

UTP: uracilo trifosfato

V_e: volumen de exclusión

XMIPP: "X-windows based Microscopy Image Processin Package"



1. Introducción

1.1. La replicación de ADN

El ciclo celular comprende una serie ordenada de procesos donde se produce el crecimiento y la división celular. Durante la división celular se obtienen dos células hijas con idéntica información genómica. El ciclo celular se divide en cuatro fases sucesivas: G1, donde la célula acumula nutrientes y su material genético se prepara para la replicación; S, donde tiene lugar la replicación; G2, fase en la que la célula se prepara para la división; y por último la fase M, de mitosis o división celular, donde se producen dos células con el mismo material genético en cada una de ellas (Figura 1.1).

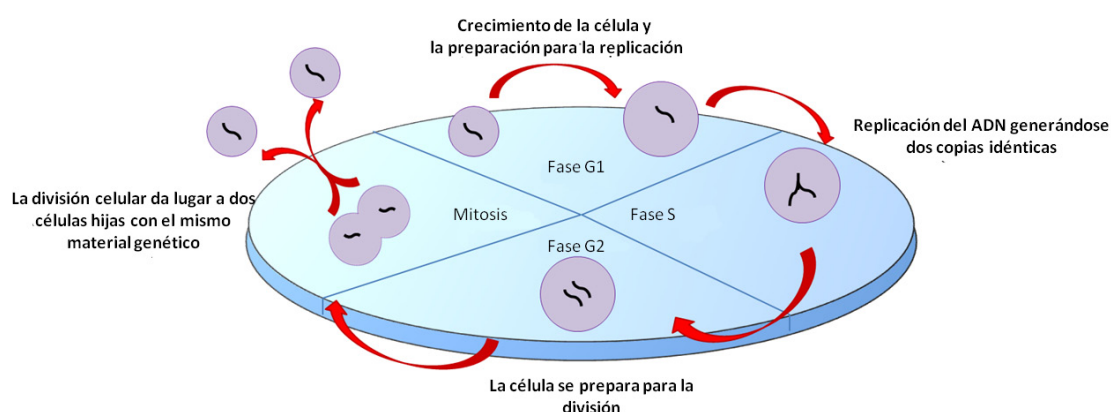


Figura 1.1. Esquema representativo del ciclo celular. Se muestran las diferentes fases que componen el ciclo celular y los cambios que sufre la célula durante cada fase. Junto a cada fase aparece explicado brevemente el proceso que tiene lugar.

La correcta replicación del ADN es un proceso esencial para la transmisión íntegra de la información genética durante la división celular. Este paso tiene que estar estrechamente regulado para que por cada ciclo celular el ADN se replique una sola vez. Errores en el proceso de la duplicación de ADN pueden generar mutaciones puntuales y/o aneuploidías teniendo como consecuencia diferentes enfermedades genéticas humanas. Las enfermedades pueden alcanzar desde defectos de nacimiento hasta distintos tipos de cáncer y anomalías en el desarrollo. Diversos mecanismos moleculares han ido evolucionando para asegurar la duplicación exacta del ADN una única vez por cada ciclo celular y la segregación equitativa del material genético en cada célula hija formada (Sclafani & Holzen, 2007).

En 1953, Watson y Crick publicaron la estructura de doble cadena del ADN (dsADN) y su naturaleza. Este modelo de ADN estableció el mecanismo de la replicación semiconservativa, donde al final se generan dos moléculas de dsADN, cada una de ellas con una hebra parental y otra recién sintetizada (Watson & Crick, 1953).



La replicación de ADN se divide en dos fases: la fase de iniciación y la de elongación. En la fase de iniciación las proteínas iniciadoras se unen al llamado “origen de replicación” (el lugar del genoma donde se inicia la replicación), inician la separación de las hebras, protegen las hebras de cadena sencilla expuestas y reclutan al resto de los cofactores o enzimas cuya actividad catalítica es necesaria para que sea posible la síntesis de ADN. En la fase de elongación se sintetiza el ADN. En esta fase la ADN polimerasa desempeña un papel principal (Kelman & Hurwitz, 2003; Machida et al, 2005; Mendez & Stillman, 2003).

1.1.1. Fase inicial de la replicación

El proceso de la replicación se inicia en las regiones del genoma denominadas “orígenes de replicación”. En los organismos procariotas, virales, arqueas y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* las regiones del origen están definidas por secuencias específicas. Sin embargo, en la mayoría de eucariotas, no se conoce aun una secuencia que determine estas regiones. Los sitios de origen forman estructuras en la cromatina que favorecen la unión de proteínas iniciadoras, como los miembros del complejo ORC (de las siglas en inglés “Origin Recognition Complex”, formado por seis proteínas Orc1-6). Los iniciadores formarán una maquinaria multi-proteica que acabará generando dos horquillas replicativas. Ambas horquillas actúan en direcciones opuestas comenzando en los orígenes de replicación y procediendo bidireccionalmente hasta obtener la copia de ADN (Remus & Diffley, 2009; Sclafani & Holzen, 2007; Yardimci et al, 2010).

Mientras que los organismos bacterianos solo necesitan un único origen de replicación para completar la replicación de su ADN, los eucariotas, debido a su gran tamaño, necesitan muchos a lo largo de cada cromosoma. Las arqueas sin embargo, necesitan dos o más orígenes de replicación (Grabowski & Kelman, 2003; Kelman & White, 2005).

1.1.1.1. Formación del complejo pre-Replicativo (pre-RC) en eucariotas

En los estadíos tardíos de la mitosis y en la fase G1 del ciclo celular, el complejo proteico ORC reconoce y se une al origen de replicación en un proceso dependiente de ATP. De esta manera, marca el origen y da lugar a la primera fase conocida como “reconocimiento” de la replicación.

Posteriormente, la proteína Cdc6 se asocia al heterohexámero ORC junto con Cdt1. Cdt1 transporta consigo, en su forma inactiva, otro complejo de seis componentes denominado Mcm2-7 (de siglas en inglés “Mini Chromosome Maintenance”) (Figura 1.2A). El ensamblaje del complejo Mcm2-7 requiere que Cdc6 y ORC hidrolicen ATP. Una vez cargado el complejo Mcm2-7 en el ADN, se forma el llamado complejo pre-Replicativo (pre-RC) iniciando la replicación. Este proceso se conoce como licenciamiento (“licensing”). El objetivo de la formación del pre-RC es cargar el complejo Mcm2-7 en el origen de replicación, para poder iniciar el desenrollamiento de dsADN (Revisado en las referencias: (Bell & Dutta, 2002; Bowers et al, 2004; DePamphilis et al, 2006; Machida et al, 2005; Mendez & Stillman, 2003; Sclafani & Holzen, 2007)).

1.1.1.2. Complejo de pre-Iniciación (pre-IC) y activación de la replicación

Cuando la célula entra en la fase S del ciclo celular los orígenes marcados con pre-RC son activados. La actividad de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y la quinasa dependiente de Dbf4 (DDK) resulta esencial para promover el ensamblaje de las horquillas replicativas. Estas dos quinasas son las causantes de la activación del pre-RC. Esta activación en parte se da por la fosforilación de Mcm 2-7 (Lei & Tye, 2001). La activación del complejo pre-RC lleva a una reorganización que consiste en la eliminación de Cdc6 y Cdt1 y la incorporación de nuevos factores como Cdc45, Mcm10, el complejo GINS, Sld2, Sld3 y TopBP1 (Dpb11 en levaduras) entre otros (Remus & Diffley, 2009). Estas proteínas forman un nuevo complejo conocido como el complejo de pre-Iniciación (pre-IC) (Figura 1.2B) (Mendez & Stillman, 2003; Takeda & Dutta, 2005).

Estudios realizados en *S. cerevisiae* han llevado a entender mejor el mecanismo de la fase de iniciación y elongación de la replicación. Las quinasas CDK y DDK son las causantes de la activación de los sitios de replicación, como ya se ha mencionado con anterioridad. La CDK fosforila tanto a la proteína Sld2 como a la Sld3, permitiendo así la interacción de ambas con la proteína iniciadora TopBP1. A su vez, Sld3 interactúa con el cofactor Cdc45 que parece ensamblarse al sitio de origen por medio de su interacción con el complejo Mcm2-7. Sld2 y TopBP1 junto con la polimerasa ϵ y el tetrámero GINS forman un complejo conocido como “pre-Loading Complex” (pre-LC) (Johansson & Macneill, 2010; MacNeill, 2010). TopBp1 actuaría como puente para unir Cdc45-Sld3 con Sld2, ensamblando el complejo pre-LC al origen. Esto activa al complejo Mcm2-7, formando a su vez el complejo CMG (comentado más adelante) que parece ser el núcleo de un complejo superior de macromoléculas denominado el

complejo de progresión del replisoma (RPC, de las siglas en inglés “Replisome Progression Complex”) (Figura 1.2C).

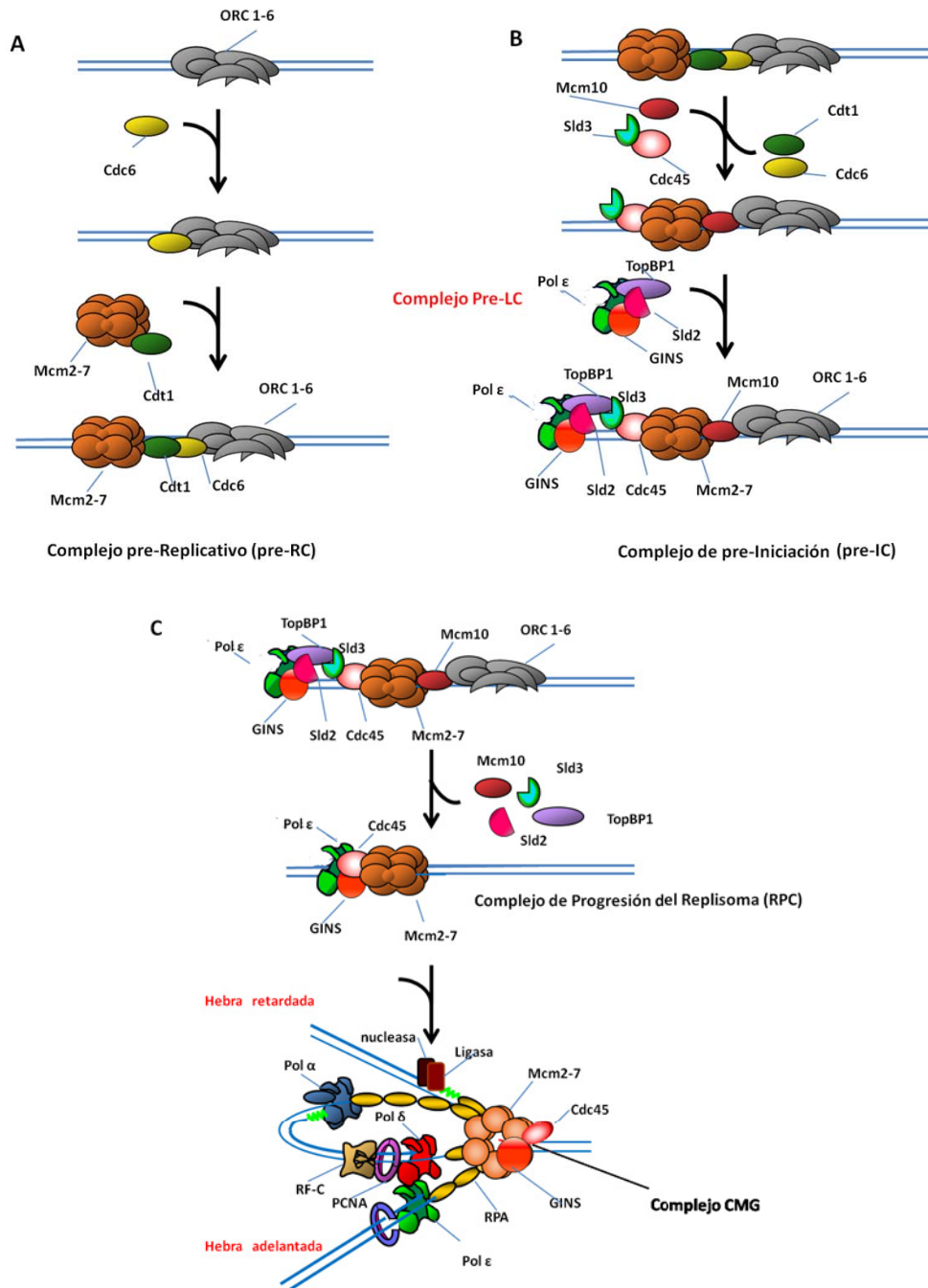


Figura 1.2. El proceso de la replicación del ADN en eucariotas. **A.** La formación del complejo pre-Replicativo. Tras la unión de ORC a los sitios de origen de la replicación, se unen los iniciadores Cdc6 y Cdt1 que son responsables del ensamblaje del complejo Mcm2-7 inactivo. **B.** Reorganización del complejo pre-RC que lleva a la disociación de Cdc6 y Cdt1, junto al ensamblaje de otros iniciadores, entre ellos el complejo “pre-Loading Complex” (pre-LC). Se forma el complejo de pre-Iniciación (pre-IC). **C.** Por último, se disocian Mcm10, TopBP1, Sld2 y Sld3 para formar el llamado Complejo de Progresión del Replisoma (RPC). Se inicia el desenrollamiento de la doble hélice de ADN y a continuación, se reclutan las proteínas necesarias para que comience la síntesis del ADN. El movimiento de este complejo se adapta al de la horquilla de replicación.

1.1.2. Ensamblaje de los factores implicados en la fase de elongación

Tras la fase de iniciación de la replicación tiene lugar la fase de elongación, en la que se sintetiza el ADN. Para comenzar la síntesis de ADN es necesario el ensamblaje de varias proteínas que forman el “replisoma”. Este complejo replicativo, avanza bidireccionalmente junto a las horquillas de replicación (Chagin et al, 2010; Yardimci et al, 2010) .

La doble hélice del ADN está compuesta por dos hebras con polaridades opuestas. La ADN polimerasa sintetiza las nuevas cadenas de ADN y solo tiene capacidad para funcionar en dirección de 5' a 3'. Por tanto, de las dos hebras antiparalelas solo una será sintetizada de forma continua, la hebra adelantada o continua. La hebra discontinua o retardada se sintetiza discontinuamente mediante pequeños fragmentos de ADN de cadena sencilla (ssADN), denominados fragmentos de Okazaki.

En las células eucariotas se han descrito cinco polimerasas diferentes, pero solo tres de ellas parecen estar involucradas en la síntesis del ADN: las ADN polimerasas α , δ y ϵ . Las tres conservan el sitio catalítico pero cada una está especializada en una función diferente durante la elongación (Hubscher et al, 2002; Takeda & Dutta, 2005). La ADN polimerasa α (pol α) tiene actividad primasa. Su función es sintetizar pequeños fragmentos de ARN, cebadores, y extenderlos mediante la adición de fragmentos cortos de ADN. La polimerasa α actúa tanto en la cadena continua como en la discontinua. En la continua solo sintetiza cebadores en el sitio de inicio, mientras que en la hebra discontinua la acción de la primasa es necesaria al inicio de cada fragmento de Okazaki. La síntesis de estos cebadores, posibilita el inicio de la síntesis de ADN de las otras polimerasas. Las polimerasas δ y ϵ (pol δ y pol ϵ) sintetizan el ADN a partir de los cebadores. La polimerasa δ se encarga de la síntesis del ADN en la cadena discontinua y la polimerasa ϵ en la continua (Kunkel & Burgers, 2008; Takeda & Dutta, 2005; Waga & Stillman, 1998).

En la fase de elongación, una vez activado el complejo RPC se desplaza junto con las horquillas replicativas de forma bidireccional. En este punto hay factores como ORC que se mantienen unidos al origen de replicación, mientras que GINS, Cdc45, Mcm2-7 y las polimerasas se desplazan junto con las horquillas. El resto de factores se disocian del replisoma (MacNeill, 2010).

Una vez que la doble hélice empieza a desenrollarse, la polimerasa α inicia la síntesis de los cebadores en ambas hebras de ADN. Al instante, el complejo denominado factor de replicación RFC (de las siglas en inglés “Replication Factor Complex”) ensambla en el ADN el





complejo PCNA (de las siglas en inglés “Proliferating Cell Nuclear Antigen”), el factor de procesividad de las ADN polimerasas δ y ϵ . Después, las polimerasas δ y ϵ se unen al complejo que forman PCNA, el cebador y el ADN molde. El factor de procesividad PCNA rodea la doble cadena de ADN y une las polimerasas δ y ϵ , con sus respectivos moldes de ADN. Así es como favorece la procesividad de las polimerasas. En este punto de la elongación se disocia la polimerasa α (Figura 1.2C) (Garg & Burgers, 2005; Johansson & Macneill, 2010; Takeda & Dutta, 2005)

La síntesis de la hebra adelantada es muy eficiente y rápida. Se sintetiza nada más activarse la ADN polimerasa y en la misma dirección en la que la helicasa desenrolla el ADN. En cambio, este proceso es más complejo en la hebra retardada que requiere la síntesis de los cebadores y extenderlos numerosas veces. Los fragmentos Okazaki formados son procesados por nucleasas y ADN ligasas que conjuntamente transformarán los pequeños fragmentos separados en una única hebra de ADN continua. Las síntesis de la hebra adelantada y retardada se encuentran acopladas para asegurar la síntesis completa del ADN.

Hay otros dos componentes esenciales en la elongación. Las proteínas de unión a cadena sencilla y las topoisomerasas. Las primeras estabilizan el ssADN generada tras la actividad helicasa. En eucariotas se denominan RPA (de sus siglas en inglés “Replication Protein A”). Las topoisomerasas se encargan de relajar la tensión o superenrollamiento producido por las helicasas al separar las dos cadenas.

1.2. Helicasas replicativas

1.2.1. Características generales

Las helicasas son proteínas motoras que aprovechan la energía libre obtenida de la hidrólisis de ATP para catalizar la reacción de separación de las hebras de dsADN. Las helicasas rompen los enlaces de hidrógeno establecidos entre las bases en la doble hélice y se mueven unidireccionalmente sobre la hebra de ADN a la que están asociadas, desplazando la cadena complementaria. Por ello, se considera que también son translocasas y ATPasas dependientes de ADN (Tuteja & Tuteja, 2004).

Las helicasas se encuentran en diferentes estados oligoméricos, pero la mayoría de las helicasas replicativas son hexaméricas y forman anillos. Las helicasas replicativas unen el ADN en su cavidad central y la forma de anillo les da la oportunidad de avanzar sobre la longitud del

cromosoma sin necesidad de disociarse. Hay helicasas capaces de oligomerizar sin necesidad de ningún cofactor, pero otras necesitan cofactores, como los nucleótidos, para formar complejos hexaméricos (Bochman & Schwacha, 2009; Davey & O'Donnell, 2003) .

La mayoría de las helicasas muestran unión a ADN dependiente de ATP. Aparentemente, la unión a ATP da lugar a un cambio conformacional que facilita la unión a ADN. De hecho estas proteínas se unen con mayor afinidad a ssADN que al dsADN (excepto SV40, RecBCD y la helicasa RuvB que tienen preferencia por el dsADN). Se ha comprobado que muchas de ellas necesitan ADN en forma de horquilla de replicación para separar las hebras óptimamente (Tuteja & Tuteja, 2004). A su vez, la capacidad de hidrólisis de ATP de la mayoría de las helicasas se estimula en presencia de ADN (Patel & Picha, 2000).

1.2.2. *DnaB la helicasa bacteriana*

La maquinaria necesaria para la replicación se ha diferenciado en el proceso evolutivo en dos ramas: una, la compartida por eucariotas y arqueas y la otra la de las bacterias. A pesar de su similitud en el mecanismo y estructura, los principales componentes de la replicación del ADN comparten baja homología en secuencia. La actividad helicasa replicativa en bacterias está ligada a la actividad de la proteína DnaB. En cambio, el complejo MCM cataliza la reacción de separación de las dos hebras de ADN en eucariotas y arqueas. La helicasa DnaB y el complejo MCM pertenecen a distintas familias, y hay diferencias en las características de su actividad helicasa. Por ejemplo, separan dsADN con polaridades opuestas. DnaB une en su cavidad central la hebra retardada y desplaza la adelantada, mientras que el complejo MCM de arqueas y eucariotas actúan de forma contraria.

La helicasa bacteriana DnaB ha sido el objeto de estudio en varios trabajos. Análisis realizados por microscopía electrónica han mostrado dos posibles simetrías para la estructura de DnaB: simetría tres o seis (Yang et al, 2002). Este homohexámero puede unir tanto ADN de cadena sencilla como de doble cadena. DnaB muestra actividad helicasa con polaridad 5'-3' y actividad ATPasa dependiente de ADN (Shin & Kelman, 2006). La estructura cristalográfica de la proteína (Bailey et al, 2007a) revela que DnaB se divide en dos dominios separados por un fragmento de unión flexible ("linker"): un dominio C-terminal (CTD) y otro N-terminal (NTD). El dominio C-terminal tiene una estructura similar a Rec A y contiene los sitios de unión a nucleótidos (NTP) y al ADN (Bailey et al, 2007b). Cada dominio adquiere una simetría diferente



dentro de la estructura de DnaB formando un anillo hexamérico compuesto por dos capas diferenciadas.

1.2.3. Las MCM

Los genes MCM fueron identificados por primera vez en un *screening* genético realizado por el laboratorio de Dra. Bik Tye en 1984, en la búsqueda de genes necesarios para el mantenimiento de plásmidos de *S. cerevisiae* (Maine et al, 1984). Posteriormente, se identificaron ancestros de los genes MCM en arqueas (Kearsey & Labib, 1998) y en un virus bacteriófago, integrado en el genoma de *Bacillus cereus* (McGeoch & Bell, 2005). Sin embargo hasta el momento, no se ha encontrado ninguna evidencia de la posible existencia de genes MCM en otros procariotas. Dentro de la familia MCM, seis genes (Mcm2-7) son los conservados en todos los eucariotas. En cambio, las arqueas contienen un único gen MCM. Este gen, parece guardar una mayor similitud con la proteína Mcm4 que con el resto de las MCMs de eucariotas (Tye, 1999).

1.2.3.1. MCM en arqueas

Se han identificado homólogos de las proteínas MCM en varias especies de arqueas, aunque las más estudiadas y caracterizadas bioquímicamente *in vitro* son la de *Methanobacterium thermoautotrophicus* (MthMCM) y la de *Sulfolobus solfataricus* (SsoMCM). Todos estos estudios sugieren que ambas proteínas no son completamente idénticas, sino que guardan ciertas diferencias entre ellas. Estas diferencias son de carácter bioquímico y estructural. Distintos estudios estructurales de complejos MCMs en arqueas han hallado estructuras de hélice, hexámeros, heptámeros, doble hexámeros y doble heptámeros.

Bioquímicamente las MCMs se han descrito como enzimas con actividad helicasa dependiente de ATP, capaces de separar las dos hebras de dsADN con polaridad 3'-5'. La capacidad de hidrólisis del ATP de estas proteínas es dependiente de la presencia de ADN (Jenkinson & Chong, 2006; Sakakibara et al, 2009b). Son proteínas capaces de unir tanto ssADN como dsADN. Diversos estudios han demostrado la preferencia de SsoMCM por los sustratos que contienen parte de ssADN junto con la de dsADN, como son los sustratos en forma de horquilla o de burbuja (Pucci et al, 2004; Rothenberg et al, 2007). La proteína MthMCM es capaz de desenrollar cualquier estructura de ADN, incluso con extremos romos, pero siempre en presencia de ATP y Mg^{2+} (Shin et al, 2003). Por el contrario, SsoMCM no es

capaz de desenrollar dsADN que no contenga ningún extremo de cadena simple (Barry et al, 2007).

Los estudios en organismos más simples, han contribuido enormemente a nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares de sistemas más complicados, como son los de eucariotas. Dada su importancia biológica, uno de los procesos más candentes es el estudio de la replicación del ADN. El complejo Mcm2-7 es objeto de estudio por su participación esencial en la replicación de eucariotas. Debido a las dificultades que conlleva el estudio de Mcm2-7, sus homólogos de arqueas, por su más sencillo manejo y simplicidad, han sido ampliamente utilizados como modelos para estudio de este complejo.

1.2.3.2. Complejo Mcm2-7 eucariota

Las seis proteínas que forman el complejo heterohexamérico Mcm2-7 contienen diferencias estructurales entre sí. Sin embargo, todas conservan la región perteneciente al dominio AAA+ ATPasa (hace referencia a las iniciales en Inglés de “ATPases Associate with various cellular Activities”) de 200 aminoácidos (Koonin, 1993). El complejo Mcm2-7 está implicado tanto en la fase de iniciación como en la elongación de la replicación del ADN (Forsburg, 2004; Labib et al, 2000; Tye, 1999). Cada una de las proteínas que forman el complejo es esencial para la viabilidad celular.

Varias observaciones *in vivo* apuntan a que el complejo Mcm2-7 actúa como la helicasa replicativa en células eucariotas (Bell & Dutta, 2002). A pesar de ello, hasta el año 2008 (Bochman & Schwacha, 2008) no se ha podido demostrar *in vitro* la actividad helicasa del complejo heterohexamérico Mcm 2-7 (Bochman & Schwacha, 2007; Davey et al, 2003; Schwacha & Bell, 2001). Sin embargo, para los complejos homohexaméricos de arqueas y un subcomplejo hexamérico eucariota formado por solo tres de las seis proteínas (4/6/7) se observó la capacidad de desenrollar el dsADN *in vitro* (Ishimi, 1997; Kaplan et al, 2003; Lee & Hurwitz, 2001). La forma activa del subcomplejo llevó a plantear la hipótesis de que el subcomplejo 4/6/7 es la unidad catalítica del complejo Mcm2-7 y las proteínas Mcm2, 3 y 5 regulan su actividad dentro del complejo. De esta manera, mediante la disociación de las subunidades Mcm2, 3 y 5 se activaría el complejo y su capacidad de desenrollar la doble hélice. Estudios posteriores demostraron que la degradación de cualquiera de las seis proteínas inhibía la horquilla replicativa (Labib et al, 2000). Por lo tanto, se consideró la posibilidad de que el complejo Mcm2-7 necesitara formar parte de un supracomplejo, junto a Cdc45 y GINS, denominado CMG (siglas pertenecientes a las iniciales de las tres proteínas que lo forman),





que comprendiera otros componentes que estimularán su actividad helicasa (Moyer et al, 2006). Solo recientemente se detectó *in vitro* la actividad helicasa del complejo Mcm2-7, mostrando la dependencia para la actividad helicasa del complejo Mcm2-7 por ciertos aniones como acetato o glutamato (Bochman & Schwacha, 2008).

Al igual que en arqueas, la actividad helicasa del complejo Mcm2-7 es dependiente de ATP y muestra polaridad 3'-5'. En cambio, los estudios realizados en levaduras han demostrado que la actividad ATPasa no es dependiente de ADN (Bochman et al, 2008; Davey et al, 2003; Schwacha & Bell, 2001). Al contrario de lo que ocurre en las arqueas, el complejo Mcm2-7 y el subcomplejo 4/6/7 necesitan la presencia de ATP para unir ADN, siendo hasta 100 veces mayor la afinidad por el ssADN que por el dsADN (Bochman & Schwacha, 2009)

1.2.3.3. Estudios estructurales de las MCM

1.2.3.3.1. Análisis estructurales de las MCM eucariotas

Las seis proteínas que forman el complejo Mcm2-7, interaccionan entre sí formando un anillo hexamérico en ausencia de ATP exógeno. El anillo lo componen las seis Mcm diferentes (Mcm2-7) con una estequiometría 1:1:1:1:1:1, manteniendo una determinada organización dentro del anillo (Davey et al, 2003). *In vivo*, el complejo heterohexamérico Mcm2-7 es el mayoritario. Sin embargo, las Mcm también pueden encontrarse de forma individual en pequeñas cantidades o formando distintos subcomplejos.

Actualmente, no se dispone de ninguna estructura cristalográfica de las proteínas MCM eucariotas. Los estudios realizados por microscopía electrónica han mostrado la disposición en anillo del complejo Mcm2-7 y subcomplejo Mcm4/6/7 en levadura. Los anillos presentan simetría seis, de aproximadamente 145 Å de diámetro, con una cavidad central de 25-30 Å (Adachi et al, 1997; Bochman & Schwacha, 2007; Sato et al, 2000). Recientemente, se ha observado la presencia del doble hexámero del Mcm2-7 una vez unido a dsDNA (Remus et al, 2009).

1.2.3.3.2. Análisis estructural de las MCM arqueas

Los estudios estructurales realizados en las MCM de arqueas han servido como modelo para confirmar las hipótesis sobre los mecanismos de la actividad helicasa. Durante los últimos años se han obtenido estructuras a baja resolución mediante análisis de microscopía

electrónica (EM) y estructuras atómicas por difracción de rayos X. La primera estructura resuelta por difracción de rayos X fue el dominio N-terminal de la MthMCM. Este fragmento forma un doble hexámero con forma de campana y una cavidad central. El diámetro de la cavidad central permite a la proteína acomodar ssADN y dsADN (Figura 1.3A) (Fletcher et al, 2003). Más recientemente, se ha obtenido la estructura cristalográfica de la parte N-terminal de la SsoMCM que forma un anillo hexamérico simple. Comparando ambas estructuras se ha observado que la cavidad central resulta ser más estrecha para SsoMCM, favoreciendo que la proteína acomode ssADN en vez de dsADN (Figura 1.3B) (Liu et al, 2008).

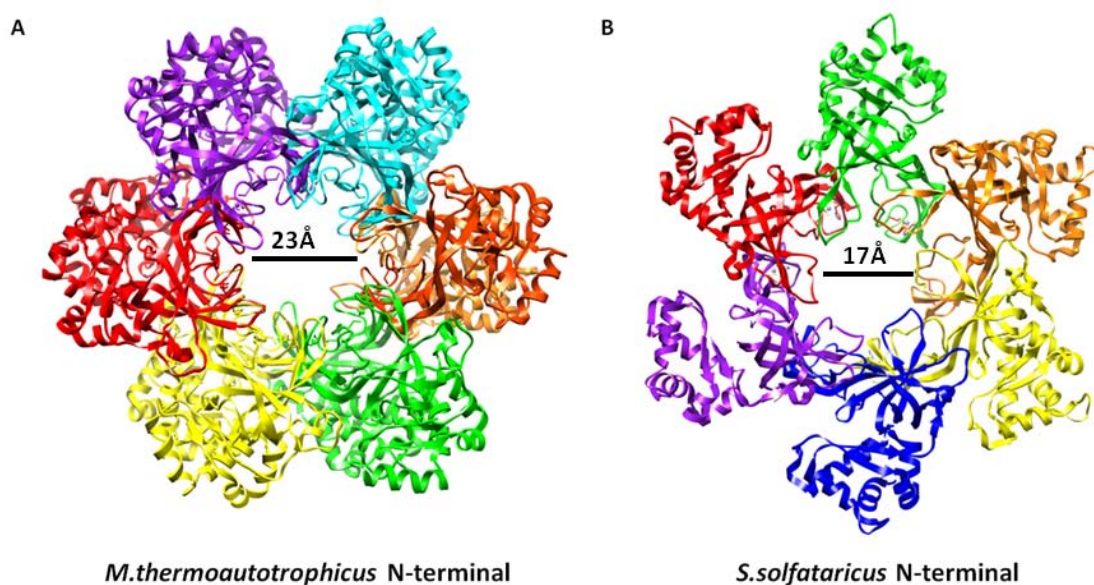


Figura 1.3. Estudio estructural del dominio N-terminal de las MCM arqueas. Estructura cristalográfica del complejo dodecamérico de *M. thermoautotrophicus* (A) (Fletcher et al, 2003) (PDB 1LTL) y del complejo hexamérico *S. solfataricus* (B) (Liu et al, 2008) (PDB 2VL6). Vista de los oligómeros con el eje de simetría seis perpendicular al plano. Cada uno de los protómeros ha sido coloreado de manera diferente. La diferencia de los diámetros de la cavidad central se puede apreciar en la figura.

La estructura de la MCM de *Methanopyrus kandleri* (MkaMCM) casi completa ha sido recientemente resuelta por métodos cristalográficos. MkaMCM se ha aislado siempre como un monómero y no presenta actividad helicasa. Sin embargo, conserva la estructura secundaria funcional correspondiente a las MCM arqueas y eucariotas (Bae et al, 2009). También se ha resuelto a baja resolución la estructura casi completa de la SsoMCM. En el cristal la proteína se encuentra como monómero, a pesar de que SsoMCM forma homohexámeros en solución (Figura 1.4A) (Brewster et al, 2008; Costa & Onesti, 2009).

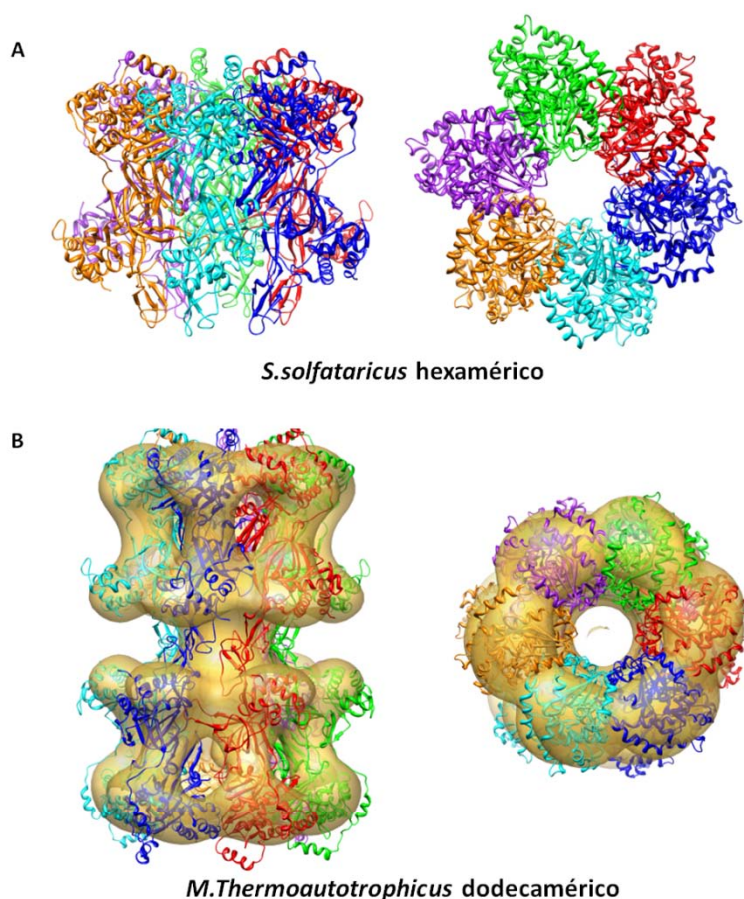


Figura 1.4. Representación estructural de las proteínas MCM arqueas. **A.** Complejo hexamérico simulado de la estructura cristalográfica de SsoMCM (Brewster et al, 2008) (PDB 3F9V). Modelo creado por ajuste con el mapa EM del complejo MthMCM. **B.** Estructura a baja resolución del complejo dodecamérico de la proteína MthMCM (Gomez-Llorente et al, 2005). Ajuste de la estructura atómica de SsoMCM en el volumen 3D obtenido por EM. En la figura se pueden observar vistas a lo largo y a través del eje de simetría C6 de ambas estructuras.

Las estructuras obtenidas a baja resolución mediante EM han generado dudas sobre el estado de oligomerización natural de la MCM. Por ejemplo, se han observado estructuras de la MthMCM como heptámero (Yu et al, 2002), hexámero (Pape et al, 2003), en forma de filamentos helicoidales (Chen et al, 2005), como doble hexámero (Figura 1.4B) (Gomez-Llorente et al, 2005) y como doble heptámero. Un estudio sobre la estructura de MthMCM, mostró la preferencia por la formación del doble hexámero en presencia de análogos de ATP no hidrolizables (AMP-PNP y ADP AIF_x) y dsADN, mientras en su ausencia, MthMCM se observó como un simple anillo hexamérico o heptamérico. MthMCM en presencia de nucleótidos formaba dobles heptámeros que se transformaban en doble hexámeros al añadir el ADN (Costa et al, 2006b). Ante esta pléyade de polimorfismos, se planteó la hipótesis de que MthMCM se podría encontrar formando complejos heptaméricos en su estado fisiológico. Una vez que el complejo se asociase a ADN, el complejo podría perder una subunidad induciendo el cierre del anillo y dando lugar a la forma hexamérica activa (Yu et al, 2002).

Las MCM arqueas, tanto en MthMCM como en SsoMCM, poseen dos cavidades: una central cargada positivamente, y luego otros seis canales dispuestos de forma perpendicular a la cavidad central en las interfaces de los dímeros. Estos canales laterales ponen en contacto la cavidad central y la parte externa de la molécula, que posiblemente juegan papel en el proceso del desenrollamiento (Brewster et al, 2008; Costa et al, 2006a).

1.2.3.4. El centro catalítico de las proteínas AAA+ ATPasa

El centro catalítico de las proteínas AAA+ ATPasa se encuentra en la superficie dimérica formada entre la intersección de dos subunidades vecinas del complejo (Figura 1.5A). Una de las subunidades aporta motivos en *cis*: motivo Walker A, Walker B y sensor I, mientras la otra aporta motivos en *trans* denominados sensor II y “dedo de Arginina” (R-finger).

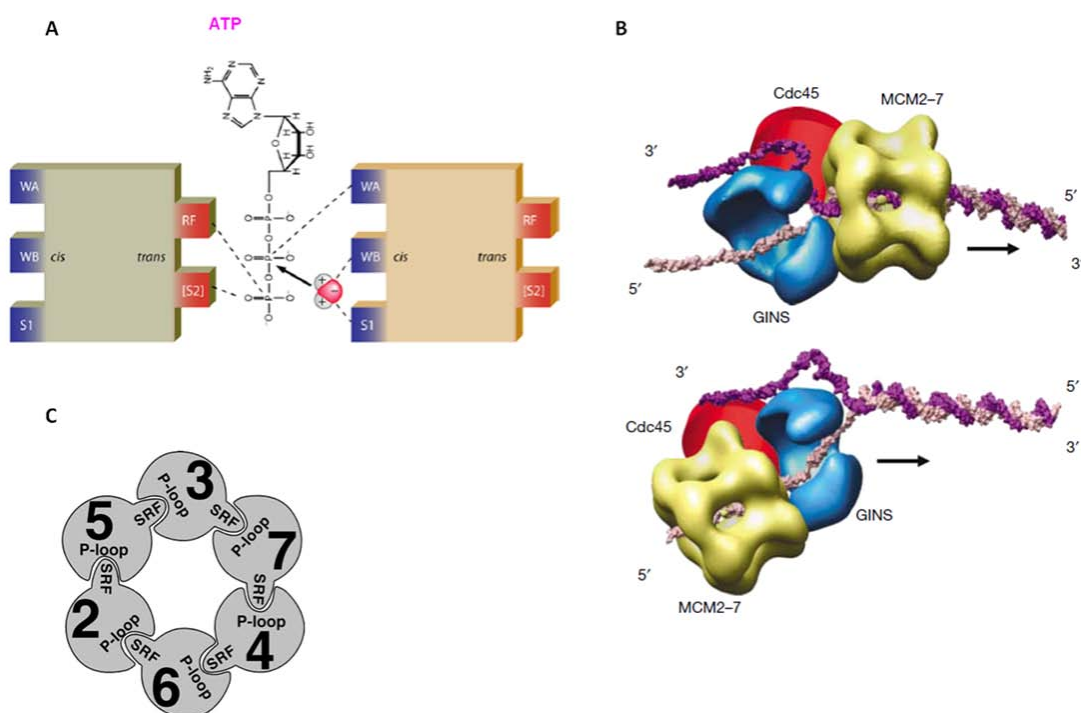


Figura 1.5. Función y organización del complejo Mcm2-7. **A.** Representación gráfica del centro catalítico ATPasa situado en la superficie formada entre dos subunidades adyacentes. Se muestran los motivos funcionales que forman el centro activo, indicando sus funciones mediante líneas discontinuas. **B.** Presentación de los dos modelos sugeridos para el complejo CMG (Cdc45-Mcm2-7-GINS) (Boskovic et al, 2007; tesis doctoral J. Coloma, 2010, U.A.M). Cada proteína que compone el complejo aparece representada en un color. El complejo Mcm2-7 aparece en amarillo, GINS en azul y la proteína Cdc45 se representa en rojo. **C.** Organización del heterohexámero Mcm2-7 basado en la interdependencia de sus actividades ATPasa (Davey et al, 2003).

El motivo Walker A es el responsable de la unión a ATP. Los motivos Walker B y sensor I son los encargados de orientar la molécula de agua en su ataque nucleofílico sobre el ATP



durante la hidrólisis. Los motivos en *trans* contactan con el γ -fosfato del ATP. El “dedo de Arginina”, aparte de contribuir a la catálisis, sirve como sensor para transmitir información entre subunidades del estado en el que se encuentra el nucleótido unido al centro catalítico. (Bochman & Schwacha, 2009; Erzberger & Berger, 2006). Esta comunicación es esencial para acoplar y propagar el cambio conformacional entre los seis centros activos del hexámero.

1.2.3.4.1. Importancia funcional de los distintos motivos del centro activo

Las MCM arqueas son complejos homohexaméricos, con seis centros activos idénticos. En cambio los centros activos formados entre las seis subunidades en el complejo Mcm2-7 son diferentes y no tienen la misma contribución en las actividades del complejo (Bochman et al, 2008, Bochman & Schwacha, 2010).

Estudios de los mutantes en los residuos Walker A, del “dedo de Arginina” y del sensor I en SsoMCM, demostraron que tras la inactividad catalítica de varias subunidades, el complejo aun seguía conservando la actividad helicasa. Exactamente eran tres las subunidades necesarias para mantener la actividad. Este hecho llevó a plantear un modelo hipotético para el mecanismo de actividad: el modelo semisecuencial. Según este modelo el complejo SsoMCM funciona como helicasa usando de un modo secuencial la hidrólisis parcial de ATP (Moreau et al, 2007).

La situación del complejo Mcm2-7 es completamente diferente. Los seis sitios catalíticos contribuyen de diferente manera en la unión a ADN del complejo, en la hidrólisis de ATP y en el desenrollamiento de la doble hélice. En la actividad ATPasa por lo menos tres de los seis sitios catalíticos son activos: Mcm3/7 con altos niveles de hidrólisis, Mcm7/4 con nivel intermedio y con niveles más bajos el sitio Mcm6/2. El complejo Mcm2-7 necesita las interacciones coordinadas de las seis subunidades para su actividad ATPasa. Una sola mutación del motivo Walker A en levaduras, en cualquiera de las subunidades, anula la capacidad de hidrólisis de toda la proteína (Schwacha & Bell, 2001). Las mutaciones en el motivo Walker A bloquean la unión a ATP y por tanto, su hidrólisis. Las mutaciones en los motivos Walker B y “dedo de Arginina”, afectan sólo a la hidrólisis del ATP (Hanson & Whiteheart, 2005). Al mutar el motivo Walker B o el “dedo de Arginina” en las distintas subunidades, no conlleva a la completa incapacidad de hidrólisis de ATP (Bochman et al, 2008). Por tanto, para la correcta interacción coordinada de las seis subunidades es esencial la unión de ATP pero no su hidrólisis. A distinción de las MCM arqueas, el complejo Mcm2-7 necesita de la presencia de ATP para la unión a ADN (Bochman & Schwacha, 2007; Chong et al, 2000; McGeoch et al,

2005). Las distintas mutaciones analizadas han demostrado que las subunidades implicadas en la unión a ADN dentro del complejo son Mcm3/7 y Mcm 7/4. Los responsables de la actividad helicasa de Mcm2-7 son los sitios catalíticos formados entre Mcm3/7, Mcm7/4 y Mcm4/6 (Bochman & Schwacha, 2010).

1.2.4. El complejo CMG

Ante las dificultades a la hora de demostrar la actividad helicasa del complejo Mcm2-7, se hipotetizó sobre la necesidad de cofactores que lo activaran para realizar su función. La proteína Cdc45 fue uno de los candidatos propuestos (Pacek & Walter, 2004). Por medio de coimmunoprecipitación se demostró la asociación entre Cdc45 y otras proteínas implicadas en la replicación del ADN, como por ejemplo la polimerasa α , algunas de las proteínas de Mcm2-7 y Sld5, que forma parte del tetramero GINS (Moyer et al, 2006).

En 2003, se identificaron por primera vez los homólogos del complejo tetramérico GINS en *Xenopus* (formado por Sld5, Psf1, Psf2 y Psf3) y se demostró su interacción con Cdc45 y el complejo Mcm2-7 (Kubota et al, 2003). Estudios posteriores realizados en *Drosophila* y levaduras han confirmado esta interacción y su relevancia en la replicación. Cdc45, Mcm2-7 y GINS forman el complejo denominado CMG. El complejo CMG se ha propuesto como posible helicasa replicativa en eucariotas (Aparicio et al, 2006; Kubota et al, 2003). Forma parte del replisoma junto con la polimerasa y primasa en la horquilla replicativa (Pacek et al, 2006). Además, el complejo CMG es esencial tanto en el inicio como en la elongación de la replicación. El complejo GINS puede actuar como intermediario entre Mcm2-7 y Cdc45 y el resto de componentes del replisoma en la horquilla de replicación (Gambus et al, 2006).

Se han propuesto dos modelos para la organización estructural del complejo CMG (Figura 1.5B) (Boskovic et al, 2007). En el primer modelo, el complejo Mcm2-7 por rotación helicoidal bombearía el ADN a través de su cavidad central desestabilizando la doble hélice. GINS estaría localizado en la zona de extrusión del ADN del complejo Mcm2-7, actuando como un elemento de “arado” o separador de las dos hebras (Takahashi et al, 2005). De esta manera GINS mantendría las hebras separadas, evitando su asociación y permitiendo la unión de las polimerasas y otros factores al ssADN. En el segundo modelo, el complejo GINS, localizado delante de Mcm2-7, actuaría como un filo empujado por el desplazamiento del complejo Mcm2-7 para promover el desenrollamiento de la doble hélice. En el primer modelo, Mcm2-7 rodearía dsADN mientras que en el segundo solo una hebra atravesaría la cavidad central del

complejo. El segundo modelo es el más parecido al propuesto para la helicasa Mcm4/6/7 (Kaplan et al, 2003).

Recientemente, el complejo CMG de *Drosophila* fue reconstituido *in vitro* (Ilves et al, 2010). El complejo Mcm2-7 se activa por la asociación con Cdc45 y GINS, afectando al desenrollamiento de dsADN, aumentando la actividad ATPasa y mejorando el reconocimiento de ADN como sustrato (Ilves et al, 2010). Se cree que esta activación es una consecuencia del cambio alostérico en el complejo Mcm2-7 creado por la asociación de Cdc45 y GINS. Este cambio alostérico, ayuda a la correcta coordinación de las seis subunidades dentro del complejo Mcm2-7.

1.3. DNA primasas

Las ADN primasas son enzimas que catalizan la síntesis de los cebadores de ARN. Su actividad resulta esencial para la síntesis de ADN en la replicación. Las primasas actúan en la hebra continua y en la discontinua. En la continua sintetizan un único cebador en el origen replicativo. En cambio, en la discontinua los cebadores son necesarios al inicio de cada fragmento de Okazaki. Los cebadores posibilitan la síntesis de ADN de las polimerasas.

Las primasas se pueden dividir en dos clases: las procariotas y las de organismos superiores eucariotas. Las primasas procarióticas se encuentran asociadas a la ADN helicasa replicativa. Entre las primasas de los organismos superiores se encuentra la primasa heterodimérica de las eucariotas. La ADN primasa eucariota forma un complejo con la ADN polimerasa α y su subunidad B (Frick & Richardson, 2001). A pesar de tener la misma función, las primasas de procariotas y de eucariotas tienen diferencias en sus secuencias y estructuras. No hay una relación evolutiva entre las primasas en contraste con lo que ocurre con otras proteínas de la maquinaria replicativa.

1.3.1. Primasas de procariotas

En este grupo se encuentran las primasas de bacterias y bacteriófagos que suelen encontrarse asociadas a la helicasa replicativa. Son proteínas monoméricas que contienen tres dominios: un dominio N-terminal, un dominio ARN polimerasa central y un extremo C-terminal. El dominio N-terminal tiene motivos de unión a Zn^{2+} que están implicados en la unión al ADN. El extremo C-terminal puede ser una helicasa o una región que interacciona con la ADN

helicasa. La primasa del bacteriófago T7, la primasa DnaG de la *E. coli* y la primasa del bacteriófago T4 son algunas de las primasas procariotas.

1.3.2. DNA primasas eucarióticas

Estas enzimas se purifican como un complejo de un peso molecular de alrededor de 300 kDa, formado por cuatro proteínas. Estas proteínas son la ADN polimerasa α de 180 kDa, la subunidad B polimerasa de 70 kDa, y otras dos subunidades primasas de 49 y 58 kDa, Pri1 y Pri2 respectivamente (Plevani et al, 1988). La polimerasa α contiene el centro activo para la síntesis del ADN y Pri1 contiene el centro activo para la síntesis del ARN cebador. La subunidad B regula la actividad de la polimerasa α y Pri2 coordina la actividad de la primasa Pri1 y la polimerasa. Los genes que codifican todos las subunidades del complejo polimerasa α /primasa se han identificado en humanos, ratas, ratones, *Drosophila*, y levaduras (*S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*).

1.3.3. Síntesis de los cebadores

La síntesis del oligorribonucleótido que sirve como cebador se realiza en cinco etapas: una primera en la que se lleva a cabo la unión al ADN que sirve como molde, la unión al nucleótido, iniciación, extensión del cebador y por último, la transferencia del oligorribonucleótido sintetizado a la polimerasa.

En eucariotas las primasas están unidas a la polimerasa dentro del complejo. Por tanto, los cebadores se transfieren directamente sin que la primasa se disocie del ADN molde o del complejo (Sheaff et al, 1994). Sin embargo, en procariotas no existe esta estrecha unión entre la primasa y la polimerasa. La primasa de procariotas está continuamente asociándose y disociándose de la horquilla de replicación para sintetizar los distintos cebadores a lo largo del ADN de molde (Nakai & Richardson, 1988; Wu et al, 1992).

1.3.4. La función de la helicasa en la síntesis del cebador

La helicasa influye en la función de la primasa de varias maneras, localiza la primasa al ADN y la transporta a su punto de reconocimiento. Además, coordina la acción de la primasa con la de la polimerasa.





En *E. coli* la primasa DnaG forma un complejo con la helicasa DnaB. Esta unión beneficia a DnaG en la síntesis de cebadores. La asociación de DnaB y DnaG provoca la pérdida de especificidad de la primasa por los sitios de ADN. De esta manera, DnaG sintetiza cebadores en moldes de ADN que no reconoce (Yoda & Okazaki, 1991). Esta pérdida de especificidad permite a la primasa actuar de forma diferente en la hebra adelantada y en la retrasada (Bhattacharyya & Griep, 2000). La asociación DnaB-DnaG facilita la síntesis de la hebra discontinua, y determina la longitud de los cebadores sintetizados (Johnson et al, 2000). Realmente, la interacción entre DnaG y DnaB lleva a una co-regulación de la función de ambos. La DnaG primasa incrementa tanto la actividad ATPasa como la helicasa de la DnaB (Bird et al, 2000; Corn & Berger, 2006).

En eucariotas, también existe una contribución entre la primasa y la helicasa. La presencia de la helicasa LTag (de las siglas en inglés “Large Tumor Antigen”) del virus SV40 estimula la síntesis de cebadores del complejo polimerasa α / primasa. Esta estimulación permite la síntesis de los fragmentos de Okazaki (Collins & Kelly, 1991). La estimulación por la helicasa, ocurre en la hebra discontinua pero no en la continua (Murakami et al, 1992). Hay evidencias de la interacción física entre la helicasa LTag y el complejo Pol α /primasa en células humanas infectadas por el virus SV40. Esta interacción se da entre LTag y la subunidad polimerasa α y la subunidad B (Collins et al, 1993; Dornreiter et al, 1990; Dornreiter et al, 1993). La helicasa LTag determina y estimula el aumento de la longitud de los cebadores y de los fragmentos Okazaki.

1.4. MCM en *Bacillus cereus* (BcMCM): un complejo MCM helicasa-primasa

Mediante estudios de homología de secuencias realizados sobre helicasas replicativas en arqueas y eucariotas se ha identificado en el genoma bacteriano de *Bacillus cereus* (ATCC14579) un gen (BC1863) que codifica una proteína relacionada con las MCMs (BcMCM) (Ivanova et al, 2003). El origen de la BcMCM proviene de la integración de un fago (phBC6A51) y se localiza en una unidad policistónica de transcripción inmediatamente anterior al gen de la polimerasa del fago. La proteína contiene una parte C-terminal homóloga al dominio AAA+ de las MCM, y una parte N-terminal homóloga a la subunidad catalítica de las ADN primasas de arqueas y eucariotas (Iyer et al, 2005). Esta combinación de dominios primasa y motivos MCM helicasa en una única proteína hasta la fecha no ha sido descrita en arqueas o eucariotas (McGeoch & Bell, 2005). La naturaleza de esta proteína recuerda a la primasa-helicasa del

bacteriófago T7, el cual ha sido objeto de diversos estudios estructurales. Sin embargo, la primasa-helicasa de T7 está estrechamente relacionada con la primasa y helicasa de *E. coli*, DnaG y DnaB (Frick & Richardson, 2001). Los estudios usando modelos procariotas y virales han contribuido enormemente a nuestro conocimiento de los mecanismos de función de proteínas más complicadas, como son las proteínas de eucariotas. Por lo tanto, la dilucidación de la estructura de BcMCM puede aportar información valiosa que nos permitiría realizar estudios de estructura función para comprender el mecanismo de acción de la familia MCM de proteínas.


1.4.1. Evolución de la maquinaria replicativa del ADN

De la evolución de la vida, surgieron los tres principales dominios de organismos celulares: bacterias, arqueas y eucariotas. Todos provenían del último ancestro común, LUCA (del inglés “Last Universal Cellular Ancestor”). En el proceso evolutivo, la maquinaria replicativa se diferenció en dos: por un lado la compartida por eucariotas y arqueas, y por otro la de las bacterias. A pesar de su similitud en el mecanismo y estructura, comparten baja homología en los principales componentes de la replicación del ADN (Tye, 2000; Woese & Fox, 1977).

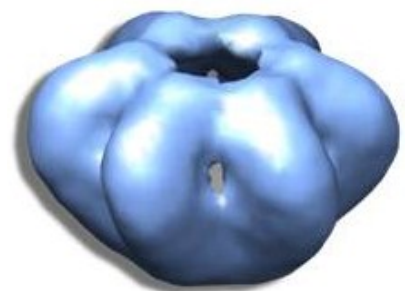
1.4.2. La teoría “replicon takeover”

Estudios de genómica comparativa han descubierto diversos casos de proteínas no homólogas de distintas especies que conservan una misma función. Un ejemplo es la similitud estructural y funcional de las helicasas replicativas DnaB y MCM. Forterrer ofreció una explicación mediante la hipótesis “replicon takeover”: las proteínas replicativas de arqueas y eucariotas evolucionaron mediante un desplazamiento génico no-ortólogo por la acción de invasores virales o plasmídicos, justo después de la divergencia (Forterre, 1999; McGeoch & Bell, 2008). Como consecuencia de una infección viral, la maquinaria replicativa del ancestro fue sustituida por la del virus. El material genético del virus se recombinó con el material genético del huésped inactivando sus funciones replicativas. De esta manera, el huésped depende de la maquinaria replicativa del virus. El gen MCM integrado en el genoma de *B. cereus* por acción de un fago, avala esta teoría. La helicasa replicativa DnaB de la bacteria está sustituida por la helicasa MCM impuesta por la maquinaria del virus (McGeoch & Bell, 2005).

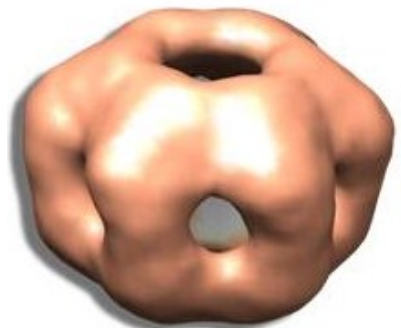
1.4.3. Características bioquímicas de BcMCM



Recientemente han sido descritas algunas características funcionales de la proteína BcMCM (Samuels et al, 2009). BcMCM es una proteína de la familia MCM, con el dominio AAA+ ATPasa conservado en su parte C-terminal y con un dominio primasa sustituyendo la típica estructura N-terminal de las MCMs. Últimamente, han sido publicados algunos ensayos bioquímicos realizados con la proteína BcMCM recombinante (Samuels et al, 2009). La proteína se purificó como monómero y presentó una actividad helicasa dependiente de ATP con polaridad de 3'-5', igual que las MCMs de arqueas y eucariotas. Su capacidad de hidrolizar ATP es estimulada por la presencia de ssADN, característica propia del dominio AAA+ conservado que posee. La capacidad de los dominios aislados (BcMCM¹⁻³⁹⁹ para la primasa y BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁸ para la helicasa) de unir ssADN, sugiere que la afinidad de unión al ADN de la proteína completa depende de ambos dominios. La proteína BcMCM posee un sitio de unión de Zn²⁺ en la parte amino terminal, con la posibilidad de imitar la parte N-terminal de otras MCMs (Samuels et al, 2009). No se detectó capacidad alguna para sintetizar cebadores de ARN de la proteína BcMCM. Además, no se ha aportado dato alguno de las características estructurales de la proteína.



2. Objetivos

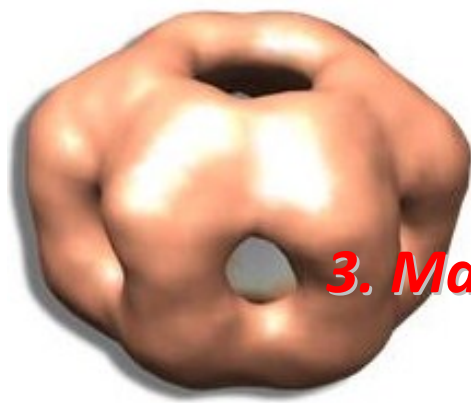


Objetivos

El objetivo de esta tesis doctoral es analizar la relación estructura/función de las helicasas de la familia MCM implicadas en el proceso de replicación de ADN. Para ello, se ha empleado como sistema modelo la primasa-helicasa de *B. cereus*, BcMCM.

Para cumplir este objetivo se plantearon los siguientes hitos dentro de esta tesis doctoral:

1. Obtener la proteína BcMCM completa y sus dominios helicasa y primasa de forma soluble para su posterior caracterización biofísica, bioquímica y estructural.
2. Caracterizar funcionalmente la proteína BcMCM y sus dominios helicasa y primasa mediante estudios bioquímicos y biofísicos.
3. Dilucidar la estructura del homohexámero BcMCM libre de ácidos nucleicos y unido a ADN. Describir posibles cambios conformacionales causados por la interacción de la proteína con el ADN.
4. Localizar los dominios helicasa y primasa dentro del complejo BcMCM.
5. Combinar la información estructural con los datos bioquímicos obtenidos para, en último término, proponer un modelo que explique el mecanismo funcional de BcMCM en la replicación de ADN.



3. Materiales y Métodos

3.1. Clonaje y expresión de proteínas

3.1.1. BcMCM silvestre

El clonaje se llevó a cabo partiendo del ADN genómico de *Bacillus cereus* (ATCC 14579) en el que se encuentra integrado el gen (BC1863) que codifica la proteína BcMCM. El gen se amplificó usando los oligonucleótidos FwpETM30MCM y RvpETM30MCM que aparecen en la tabla 1.

Nombre	Secuencias
FwpTM30MCM	5'-CCCGGGGCCATGGCAAAAAGAAAGATAAA -3'
RvpTM30MCM	5'-CCCGGGTCGAGTTAGTAGTACTCATCCTG-3'
FwMutWalkerA	5'-ACAGGTACTGGTGCCTCGGCGCTCATTGAAAAAGTAATG-3'
RvMutWalkerA	5'-GAGCGCCGACGCACCACTGTATCACCACGATTTT-3'
FwMutWalkerB	5'-GAAATGATTGGATTGCTGAAGATACAGGTATTACGAAA-3'
RvMutWalkerB	5'-TTTCGTAATACCTGTATCTTCAGCAATCCAAATCATTT-3'
FwMutRA	5'-AATAAGCAGGATATACGTGCTTTTGACTTTGCAGTTTTT-3'
RvMutRA	5'-AAAACTGCAAAGTCAAAGCACGTATATCCTCGTTATT-3'

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para amplificar BcMCM para su posterior subclonaje en el vector pETM30 y para la amplificación de los mutantes. Los dos primeros oligonucleótidos son los empleados en la amplificación de la proteína BcMCM. Los indicados como MutWalkerA se utilizaron para la mutación en el motivo Walker A (K653A); los MutRA, para la mutación en el “dedo de Arginina” (R782A) y los MutWalkerB para la mutación en el motivo Walker B (D711A).

El fragmento de PCR obtenido que codifica la proteína BcMCM, se clonó en el vector pETM30 sobre los sitios de restricción NcoI y XhoI. De esta manera, la proteína recombinante incluye una doble etiqueta en la parte N-terminal compuesta de seis histidinas y Glutation-S-transferasa (GST), además de un sitio de corte para la proteasa TEV (construcción BcMCM-pETM).

Para la expresión de la proteína recombinante se transformó con el vector BcMCM-pETM, en la cepa de *Escherichia coli* BL21 Star. La expresión de la proteína se llevó a cabo en un medio de cultivo de auto-inducción, YZ (1 % (p/v) triptona, 0,5 % (p/v) extracto de levadura), con 2 mM $Mg(SO_4)_2$, 0,5 M $NH_4(SO_4)_2$, 1 M KH_2NaPO_4 , 1 M de Na_2HPO_4 , 0,2 % de alfa-lactosa, 0,05 % glucosa y 0,5 % de glicerol suplementado con 50 $\mu g/mL$ de Kanamicina (Studier, 2005) a 37° C hasta que alcanzó una densidad óptica OD_{600nm} de 0,6. En este momento se



incubó el cultivo a 20° C durante las siguientes 16 h. Las células se recogieron por centrifugación y el sedimento obtenido fue ultracongelado con la ayuda de nitrógeno líquido y almacenado a -80° C.

3.1.2. Mutantes BcMCM

Mutaciones puntuales de varios residuos conservados en el centro catalítico de las AAA+ ATPasas se llevaron a cabo mediante el uso del kit de mutagénesis dirigida por PCR (Stratagene). Se mutaron a Alanina la Lisina 653 del motivo Walker A (K653A), el Aspártico 711 del Walker B (D711A) y la Arginina 782 del “dedo de Arginina” (“Arginine Finger” en Inglés) (R782A). Los plásmidos que portan las mutaciones se generaron usando como molde BcMCM-pETM, los oligonucleótidos (Tabla 1) y la polimerasa “Pfu turbo DNA Polymerase” (Stratagene). El programa de amplificación se inició con una incubación a 95° C durante un minuto, prosiguió con 18 ciclos de 95° C durante 50 segundos, 60° C 50 segundos y 68° C 10 minutos, y se finalizó con una incubación de siete minutos a 68° C. Los productos de PCR obtenidos se trataron con la enzima DpnI a 30° C durante media hora antes de su transformación en las células competentes, *E. coli* XL1. El ADN plasmídico de las colonias obtenidas fue analizado mediante secuenciación. Los plásmidos que contenían las mutaciones diseñadas fueron seleccionados y se usaron para transformar células de la cepa de expresión, *E. coli* BL21 Star. La expresión de las proteínas mutantes se realizó en las mismas condiciones que la proteína silvestre.

3.1.3. Dominio primasa de BcMCM (BcMCM¹⁻³⁶¹)

Para el diseño de la construcción que comprende el dominio primasa de BcMCM, localizado en la parte N-terminal de la proteína, se utilizaron los programas bioinformáticos: PONDR (“Predictor Of Naturally Disordered Regions”: www.pondr.com), que ayuda a predecir las regiones desordenadas intrínsecamente a lo largo de la secuencia y PROSITE (expasy.org) que facilita la búsqueda y reconocimiento de los dominios.

Utilizando el ADN genómico de *B. cereus* como molde y los oligonucleótidos BcMCMprimFw y BcMCMprimRv (Tabla 2), se amplificó el fragmento BcMCM¹⁻³⁶¹. Mediante el oligonucleótido BcMCMprimFw se introdujo en la parte N-terminal de la proteína una cola de seis histidinas y el sitio de corte para la proteasa TEV. El producto de PCR obtenido se clonó en

el vector pRSFDuet-1 utilizando los sitios de restricción NcoI y NotI. La expresión del dominio primasa se realizó con células de *E. coli* de la cepa Rosetta (DE 3). Al igual que la proteína BcMCM, la expresión del dominio primasa se realizó mediante el método de auto-inducción a una temperatura de expresión de 16° C.

Nombre	Secuencias
BcMCMprimFw	5'-GGCGCGCCATGGGCCATCACCATCATCACGAGAATCTGTATTTTCAGGGCGCAAAAAGAAAGATAAAACAAG-3'
BcMCMprimRv	5'-GCAAAGATTATGAACGTTAGCGGAAGCATGCGG-3'
BcMCMhelFw	5'-GGCGCGCCATGGGCCATCACCATCATCACGAGAATCTGTATTTTCAGGGCATGGCTGAAGAAGATGAC-3'
BcMCMhelRv	5'-CAGGCTGAGTACTACTAAGCGGCCGCATGCGG-3'

Tabla 2. Representación de las secuencias de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los dominios primasa (BvMCM¹⁻³⁶¹) y helicasa (BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹). Los oligonucleótidos BcMCMprimFw y BcMCMprimRv son los utilizados para la clonación del dominio primasa y los BcMCMhelFw y BcMCMhelRv fueron utilizados para la amplificación del dominio helicasa.

3.1.4. Dominio helicasa de BcMCM (BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹)


Las bases bioinformáticas utilizadas para el diseño de la construcción y los procesos de clonación y expresión fueron los mismos para el dominio helicasa de BcMCM que para el dominio primasa. En la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes para la amplificación del fragmento BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ (Tabla 2), introduciendo la cola de seis histidinas y el sitio de corte de la TEV en la parte N-terminal del dominio.

3.2. Purificación

3.2.1. BcMCM silvestre

El sedimento de la expresión de la proteína se resuspendió en el tampón de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 % glicerol) añadiendo los inhibidores de proteasas “Complete EDTA-free” de Roche. Tras añadir lisozima (1 mg/mL) se incubó a 4° C durante media hora y se procedió a lisar las células mediante sonicación a 4° C. Para la separación de la parte soluble, la muestra fue centrifugada a 40.000 rpm a 4° C durante media hora, usando el rotor 45Ti (Beckman). Todos los pasos de la purificación se realizaron a una temperatura de 4° C, con los tampones previamente aclimatados a esa temperatura. El sobrenadante se filtró a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,45 µm (Sartorius Minisart) antes de cargarlo en la





primera columna de afinidad *GSTrap HP* (GE Healthcare), equilibrada previamente con el tampón de lisis. La muestra se dejó cargando por recirculación durante 16 h a bajo flujo con el fin de aumentar la capacidad de unión. Las proteínas unidas inespecíficamente a la resina se eliminaron mediante un lavado utilizando el tampón de lisis suplementado con 0,1 % de tritón. La muestra se eluyó en un solo paso con el tampón de lisis suplementado con 10 mM de glutatión reducido. Las fracciones que contenían la proteína se reunieron y posteriormente se cambió el tampón de la muestra al tampón de digestión (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % glicerol y 20 mM imidazol) mediante una columna *Desalting HP* (GE Healthcare). La muestra se dejó cortando con la proteasa TEV (1/20 (p/p) relación proteína/TEV) a 4° C durante 14 h. El siguiente paso de purificación consistió en una segunda columna de afinidad de *Histrap HP* (GE Healthcare), previamente equilibrada en el tampón de digestión. La elución se realizó mediante un gradiente lineal de 20 mM a 50 mM de imidazol. Las fracciones de la proteína cortada no unidas a la columna se juntaron y se concentraron antes de su aplicación en una columna preparativa de filtración *S200 16/60 PG* (GE Healthcare), equilibrada en el tampón final (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % glycerol y 1 mM TCEP). Se analizaron las fracciones obtenidas y se juntaron las pertenecientes a la proteína monomérica, aquellas de peso molecular aparente de 117 kDa. La proteína se concentró usando una unidad de microfiltración de Amicon con una membrana porosa de límite de exclusión 50.000 Da (Millipore).

La purificación de la proteína sin eliminar la etiqueta histidina-GST (GST-BcMCM) se realizó de manera similar, con la diferencia que tras el paso por la columna de afinidad *Histrap* la muestra directamente se concentró y se aplicó sobre una columna de filtración en gel, *Superdex 200 16/60 PG*.

3.2.2. Mutantes Walker A K653A, Walker B D711A y “dedo de Arginina” R782A

La purificación de estos tres mutantes se realizó siguiendo el mismo método previamente descrito para BcMCM silvestre.

3.2.3. Dominio primasa BcMCM¹⁻³⁶¹


El sedimento obtenido para la sobreexpresión del dominio primasa (BcMCM¹⁻³⁶¹) se resuspendió en el tampón de lisis compuesto por 50 mM Tris-HCl a pH 7,5, 1 M de NaCl, 5 %

glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol e inhibidores de proteasas (“complete free EDTA tablets”, Roche). Las células resuspendidas fueron sonicadas y el lisado resultante fue centrifugado a 40000 rpm, usando el rotor 45Ti (Beckman) durante 40 minutos a 4° C. La muestra se filtró y se aplicó a una columna de *Histrap HP* (GE Healthcare) de 5 mL, previamente equilibrada en el tampón de carga (50mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 % glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol y 10 mM de imidazol). La elución de la BcMCM¹⁻³⁶⁶ se realizó a través de un gradiente lineal de 10 a 500 mM de imidazol. Las fracciones recogidas se analizaron mediante electroforesis en geles de 4-12 % poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y se juntaron aquellas que contenían la proteína. La muestra se diluyó utilizando un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 % glicerol y 5 mM β -mercaptoetanol hasta rebajar la concentración de sal hasta 80 mM NaCl. El segundo paso cromatográfico consistió en una columna de *Heparina HP* (GE Healthcare). La elución se realizó por un gradiente lineal de 80 mM a 1 M de NaCl. Tras reunir las fracciones que contenían BcMCM¹⁻³⁶⁶, se eliminó la etiqueta de histidinas por digestión con la proteasa TEV durante 14 h a 4° C. Con el fin de purificar la muestra digerida se aplicó por segunda vez la columna *Histrap HP* (GE Healthcare), previamente equilibrada en el tampón de carga (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 % glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol y 10 mM de imidazol). Se juntaron las fracciones no unidas a la columna que contenían la proteína sin etiqueta. Se concentró la muestra y se aplicó a una columna preparativa de filtración en gel, *Superdex 75 16/60* (GE Healthcare), en el tampón final de 10 mM Hepes pH 8,4, 300 mM NaCl y 1 mM DTT. El cromatograma presentó un único pico correspondiente al peso molecular del fragmento primasa (40 kDa) en su forma monomérica. Las fracciones de BcMCM¹⁻³⁶⁶ se juntaron y concentraron mediante las unidades de microfiltración de Amicon con una membrana porosa de límite de exclusión de 10.000 Da (Milipore) hasta tres diferentes concentraciones: 10 mg/mL, 20 mg/mL y 50 mg/mL. Tras alicuotar, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C.

3.2.4. Dominio helicasa BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹

El sedimento de BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ se resuspendió en el tampón de lisis compuesto por 50 mM de fosfato potásico pH 8, 300 mM NaCl, 5 % glicerol y 5 mM de β -mercaptoetanol, añadiendo inhibidores de proteasas. Tras sonicar y clarificar por centrifugación, se realizó un paso previo de precipitación con 0,25 % de polietileneimina (PEI). El sedimento formado se disolvió con diferentes concentraciones de NaCl, de las cuales se juntaron las fracciones con 400 y 600 mM de NaCl, que eran las que contenían BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹. Posteriormente, la proteína





se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para eliminar los restos de PEI. Para la purificación del dominio BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ se aplicaron los mismos pasos cromatográficos empleados para el dominio primasa. Se realizó un primer paso por una columna de *Histrap HP* (GE Healthcare), previamente equilibrada con el tampón de la lisis. Para la elución de la proteína se realizó un gradiente lineal de 10-500 mM de imidazol. Tras analizar las fracciones por SDS-PAGE, se juntaron las que contenían BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹. Antes de aplicar la muestra a una columna de 5 mL de *Heparina HP* (GE Healthcare), se diluyó para bajar la concentración de sal hasta 50 mM. La elución se realizó por un gradiente lineal de concentración de sal, de 50 mM a 1 M NaCl, en el tampón de lisis. Tras analizar las fracciones por SDS-PAGE, se observó que la mayoría de la proteína no se había unido a la columna. Se juntaron las fracciones no unidas a la columna y se dializó la muestra en el tampón de lisis para eliminar el imidazol arrastrado en la elución de la columna *Histrap*. La etiqueta de histidinas se eliminó por digestión con la proteasa TEV antes de cargar la muestra de nuevo en la columna *Histrap HP*. Esta vez, se juntaron las fracciones no unidas a la columna que contenían la proteína sin la etiqueta. El último paso cromatográfico consistió en una filtración en gel en la columna *Superosa 6 16/70* (GE Healthcare), equilibrada con el tampón compuesto por 10 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl y 1 mM DTT. El perfil cromatográfico mostró un solo pico de elución a 87,51 ml, que se asemeja al pico de elución de la Ferritina (440 kDa, 83,97 ml) utilizada en la calibración de la columna. Tras el análisis en un gel SDS-PAGE, se juntaron las fracciones del pico y se concentró la proteína hasta 7 mg/mL. La muestra de BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ pura se alicuotó, se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80° C.

3.3. Análisis del ADN co-purificado con la fracción BcMCM hexamérica

Se analizó la posible presencia de ADN en el pico que corresponde al hexámero de BcMCM, obtenido tras la filtración en gel de la proteína silvestre.

3.3.1. Estudio de la relación de absorbancia a 260 nm/280 nm

La relación de la absorbancia de la muestra a 260 nm/280 nm se evaluó en un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000). Se utilizaron 2 µL de la fracción hexamérica y de la proteína monomérica BcMCM. La absorbancia de la muestra se midió en un amplio espectro

de longitudes de onda, de 220 nm a 350 nm. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente (25° C).

3.3.2. Dicroísmo circular (CD)

Las medidas de CD fueron ejecutadas en un espectrofotómetro Jasco J-810 a 25° C, usando una cubeta de 0,2 cm de paso óptico. La concentración de la muestra utilizada fue 2,22 μ M en un tampón que contenía 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 % glicerol, 300 mM NaCl, 1 mM TCEP. La absorbancia del tampón empleado se midió y restó a cada uno de los espectros obtenidos. Se tomaron medidas entre 180 y 320 nm.

3.3.3. Obtención del ADN co-purificado con el complejo hexamérico BcMCM

El ADN co-purificado se purificó mediante el proceso de extracción con fenilcloroformo y posterior precipitación con etanol. Para ello a la muestra del pico correspondiente al hexámero se le añadió 1 μ L de glicógeno y un volumen del tampón 10 mM Tris-HCl a pH 8. Tras agitar con el “vortex”, se añadió un volumen de fenilcloroformo y se volvió a agitar con el “vortex” adecuadamente. Se centrifugó cinco minutos a 20.000 rpm en un rotor JLA 25.50 y el sobrenadante obtenido se traspasó a otro tubo. Después de añadir 10 % del volumen de acetato sódico a 3 M, se mezcló con tres volúmenes de etanol al 100 % (previamente enfriado a -20° C) y se dejó media hora en hielo seco para la precipitación. Se realizó otra centrifugación de 15 minutos a 4° C a la velocidad de 20.000 rpm y se eliminó el sobrenadante guardando el sedimento. El sedimento se secó, se lavó dos veces con 70 % de etanol con el fin de eliminar la sal y se centrifugó otros 10 minutos a 4° C. Por último, se quitó el etanol y se secó durante una hora a 37° C. El sedimento se resuspendió en agua obteniendo el ADN a la concentración de 272,6 ng/ μ L.

3.3.4. Caracterización del ADN co-purificado con el complejo BcMCM

3.3.4.1. Estudió del tamaño del ADN

El tamaño del ADN co-purificado con el hexámero de BcMCM se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa a 4 %. Como marcadores de tamaño se utilizaron 300 ng de oligonucleótidos de diferentes tamaños y naturaleza: poli (T) de 20 nt, 25 nt, 30 nt, 35 nt, 40 nt





3.4. Caracterización biofísica

36

3.4.2. Dicroísmo Circular

Las medidas de CD fueron realizadas en un espectrofotómetro Jasco J810 a 4° C, usando cubetas de 0,2 cm de paso óptico. La concentración de la proteína fue de 0,8 μ M aproximadamente en un tampón que contenía 10 mM Hepes pH 7,5 y 300 mM NaCl. La absorbancia de la solución fue medida y sustraída de cada uno de los espectros. Los espectros se promediaron a partir de 10 medidas tomadas entre 260 nm y 200 nm. El ancho de la banda fue de 1 nm, la velocidad de barrido fue de 100 nm min⁻¹ y el tiempo de respuesta fue de dos segundos. Las desnaturalizaciones térmicas se llevaron a cabo variando la temperatura de 5° C a 95° C y se monitorizaron a 220 nm.

3.4.3. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Para evaluar la monodispersidad y el estado de oligomerización de la muestra, la proteína BcMCM fue analizada en un tampón 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10% glicerol y 1 mM TCEP, a una concentración de 1,32 mg/mL (11,2 μ M). Se utilizó una cubeta de 1 cm de paso óptico en un DLS de Protein Solution de Dynapro. La muestra fue centrifugada previamente cinco minutos a 13.000 rpm en una centrifuga Eppendorf miniSpin plus para sedimentar las posibles partículas de polvo. Para analizar los resultados se promediaron 30 medidas tomadas cada 10 segundos a una temperatura de 4° C.

3.5. Caracterización Bioquímica

3.5.1. Actividad ATPasa

La actividad ATPasa fue cuantificada mediante la técnica de acoplación de la hidrólisis de ATP a la reacción de la transformación de piruvato en lactato en presencia de las enzimas piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Panuska & Goldthwait, 1980). En este ensayo se monitoriza la absorbancia del cofactor NADH a 340 nm durante su oxidación a NAD⁺, que disminuye conforme el ATP se hidroliza a ADP. La prueba se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L en el tampón ATPasa (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 0,1 mg/mL BSA) con 5 mM PEP, 2 mM NADH, 1 mM ATP y 75 u/mL de piruvato quinasa y 125 u/mL de lactato deshidrogenasa (SIGMA) incubando a 30° C. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000) empleando alícuotas de 2 μ L tomadas de la reacción cada cinco minutos, durante 30 minutos. La concentración de proteína usada para la reacción



fue de 1 μM y como sustrato de ADN se utilizó 5 nM de la cadena sencilla del M13 (Biolabs) o el ADN de doble cadena *dsADN*: 5'-CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCA CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'.

3.5.2. Ensayos de unión a ADN

La unión de la proteína BcMCM a ADN se estudió mediante el ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). Se utilizó un conjunto de sondas muy variadas. Por un lado se emplearon las sondas de ADN de secuencias politimidínicas (poli (T)) de distintos tamaños, para caracterizar la longitud mínima necesaria para la unión a ssADN. Por otro lado, se obtuvieron distintas estructuras de ADN hibridando el oligonucleótido de 60 nt (5'-ACT GGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCG-3') marcado con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, con los siguientes oligonucleótidos: *dsADN*: 5'-CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCA CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3', *3' libre*: 5'-CGATTAAGTTGGGTAA CGCC-3', *5' libre*: 5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGT-3', *dos extremos libres*: 5'-AGGGTTTTCCC AGTCACGAC-3', *horquilla*: 5'-CGATTAAGTTGGTAACGCCTTCCGACCTGGTACGTTTCG-3' y *burbuja*: 5'-CGATTAAGTTGGGTAACGGGTCCCAAAGGGTCAGTGCTGCATGTAAAACGACGGCCAGT-3'. El marcaje radioactivo de las sondas se realizó en posición 5' con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP mediante la enzima T4 polinucleótido quinasa (Biolabs). Las reacciones entre la proteína y las sondas marcadas se realizaron con distintas concentraciones de BcMCM (0,1-0,8 μM) y 1 nM de ADN en el tampón EMSA (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 % glicerol, 1 mM DTT, 10 mM $\text{Mg}(\text{oAc})_2$ y 1 mg/mL BSA) en un volumen final de 20 μL . La reacción se incubó a 25° C durante 30 minutos. La proteína se añadió a la reacción en último lugar. Tras el tiempo de incubación, las muestras se resolvieron mediante electroforesis a 10 V/cm en geles no desnaturalizantes de 5 % de poliacrilamida en el tampón de electroforesis TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico y 2 mM EDTA) a 4° C. Los geles se secaron sobre papel Whatman 3MM para la posterior visualización mediante el "fosfoimager" del retardo de la sonda marcada.

La interacción del complejo homohexamérico BcMCM con ADN se analizó mediante ensayos EMSA en presencia del análogo no hidrolizable de ATP, ATP γS (Jena). Las interacciones complejo BcMCM-ADN se llevaron a cabo en el tampón EMSA suplementado con 100 mM glutamato amónico y 0,05 % del detergente tritón a 30° C. Las muestras de la reacción se recogieron cada dos minutos y medio durante los 15 minutos de incubación y se resolvieron en geles de 4 % de poliacrilamida estándar suplementados con 5 % de glicerol en el tampón compuesto por TBE y 6 mM de $\text{Mg}(\text{oAc})_2$.

3.5.3. Actividad helicasa

La sonda *Helicasa1* de 50 nt (5'-GGGACGCGTCGGCCTGGCACGTCGGCCGCTGCGGCCAGGCACCCGATGGC-3') se marcó radiactivamente en la posición 5' con [γ 32 P]ATP y la enzima T4 polinucleótido quinasa y se hibridó con los oligonucleótidos descritos en la Tabla 3, formando distintas estructuras de ADN utilizadas en el ensayo helicasa. La actividad helicasa de las proteínas se analizó *in vitro* incubando las proteínas en presencia de 0,5 nM de ADN en el tampón helicasa (20 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 % glicerol, 0,1 mg/mL BSA, 100 μ M EDTA, 100 mM glutamato amónico y 2 mM DTT) y con 5 mM ATP en un volumen final de 20 μ L a 30° C, durante media hora. Después de 30 minutos, se añadió 10 mM Mg(oAc)₂ a cada muestra y se volvió a incubar 30 minutos a 30° C. Las reacciones se detuvieron con 4 μ L del tampón de carga (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,2 % SDS, 60 % glicerol, 100 mM EDTA, 0,03 % bromofenol y 0,03 % xileno cianol) y las muestras se resolvieron por electroforesis a 13.33 V/cm en geles no desnaturalizantes del 12 % de poliacrilamida en TBE. La reacción sin proteína utilizada como control positivo se hirvió a 95° C durante cinco minutos antes de cargarlo en el gel. Tras la electroforesis los geles se secaron sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en el "fosfoimager" para visualizar el desplazamiento de la hebra marcada.

Nombre	Secuencias
Helicasa1	5'-GGGACGCGTCGGCCTGGCACGTCGGCCGCTGCGGCCAGGCACCCGATGGC-3'
3'libre	5'-GTGCCAGGCCGACGCGTCCC-3'
5'libre	5'-GCCATCGGGTGCCTGGCCGC-3'
Romo	5'-GCCATCGGGTGCCTGGCCGACGCGCCGACGTGCCAGGCCGACGCGTCCC-3'
Helicasa2	5'-TTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGCCGACGTGCCAGGCCGACGCGTCCC-3'

Tabla 3. Representación de las secuencias de los oligonucleótidos empleados en los ensayos helicasa. Tras marcar radiactivamente la sonda *Helicasa1*, se hibridó con el resto de los oligonucleótidos para llevar a cabo el ensayo. La hibridación con los oligonucleótidos *3'libre* y *5'libre*, da lugar a una sonda con un extremo 3' y 5' libre respectivamente. El híbrido *Helicasa1-romo* forma un dsADN sin extremos libres. El conjunto *Helicasa1-Helicasa2* forma un ADN en forma de horquilla replicativa.

3.5.4. Ensayo de actividad primasa

Se estudió la capacidad de la proteína BcMCM, del mutante K653A y del dominio primasa, BcMCM¹⁻³⁶¹, de catalizar la síntesis de fragmentos de ARN. Para ello se usó como ADN molde el plásmido de una sola hebra, ssM13 (Biolab). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L usando 1 μ M de proteína y 10 nM de ssM13 en el tampón primasa (20 mM Tris-HCl



7,5, 10 mM Mg(oAc)₂, 50 mM glutamato potásico, 10 μM ZnCl₂ y 1 mM DTT) suplementado con 0,1 mM de cada ribonucleótido GTP, CTP, ATP y 0,1 μCi de [α-³²P]UTP. Tras incubar las muestras a 30° C durante una hora, se detuvo la reacción añadiendo 4 μl del tampón de carga compuesto por 95 % formamida; 0,025 % azul de bromofenol; 0,025 % SDS; 0,025 % ciano xileno FF; 0,025 % bromuro de etidio y 10 mM EDTA. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de 20 % de poliacrilamida desnaturalizados con 7 M de urea, en TBE a 16 V/cm a 4° C durante 150 minutos. Los geles se expusieron una hora sin secar en el “fosfoimager” para observar los fragmentos de ARN sintetizados.

3.6. Hexamerización

3.6.1. Ensayo de hexamerización

La reacción de hexamerización se realizó empleando 9 μM de proteína en el tampón de hexamerización (20 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM NaCl, 10 mM Mg(oAc)₂, 100 mM glutamato amónico, 10 % glicerol y 1 mM DTT) suplementado con 5 mM del análogo no hidrolizable de ATP, ATPγS, ó 5-10 mM ADP. En los ensayos de hexamerización en presencia de ADN, se añadió 18 μM de la sonda de ADN 50 nt poli (T). En ambos casos la reacción se incubó 16 h a 4° C.

3.6.2. Análisis de la hexamerización mediante cromatografía de gel filtración

Las muestras hexamerizadas en presencia y ausencia de ADN se cargaron en una columna de gel filtración analítica *Superdex 200 10/300* (GE Healthcare), preequilibrada con un tampón compuesto de 20 mM Tris-HCl pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM glutamato amónico, 10 mM Mg(oAc)₂ y 1 mM TCEP. Las fracciones de los picos de elución se analizaron en geles de 4-12 % poliacrilamida desnaturalizantes, SDS-PAGE, y se tiñeron con azul de Coomassie (Simply Blue Safe Stain, Invitrogen) para comprobar la presencia de la proteína. Los pesos moleculares aparentes correspondientes a los distintos picos de elución se calcularon usando como referencia la calibración previamente realizada de la columna.

3.6.3. Electroforesis en geles nativos

La electroforesis en condiciones nativas, omitiendo la presencia de SDS, se llevó a cabo utilizando los geles comerciales “Novex®Native NuPAGE 3-12 % Bis Tris Gel” (Invitrogen)

(Laemmli, 1970) y siguiendo las indicaciones del fabricantes. Como tampón de electroforesis se utilizó el recomendado por el fabricante: 50 mM BisTris y 50 mM Tricina a pH 6,8. Las muestras del complejo BcMCM, con y sin ADN, se aplicaron al gel una vez hexamerizadas en el tampón de hexamerización (20 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM Mg(oAc)₂, 10 % glicerol, 1 mM DTT y 100 mM glutamato amónico) suplementado con 5 mM de ATPyS. Para cada reacción se empleó 1,5 µM de BcMCM y 4 µM del sustrato de ADN 50 nt poli (T) en las reacciones en presencia de ADN. Antes de cargar las muestras en el gel, se les añadió un tampón comercial compuesto por Bis-Tris a pH 7,2, NaCl, glicerol y S Ponceau. La electroforesis se llevó a cabo a 4° C y a 150 V durante una hora seguido por otros 45 minutos a 250 V. Los geles resultantes se tiñeron con azul de Coomassie (“SimplyBlue SafeStain” de Invitrogen).

3.7. Microscopía electrónica

3.7.1. Purificación del complejo BcMCM y GST-BcMCM con ADN mediante bolas magnéticas

Los complejo BcMCM y GST-BcMCM con ADN se purificaron incubando 5 µM de proteína (BcMCM o GST-BcMCM) en su forma monomérica en el tampón de hexamerización (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM Mg(oAc)₂, 5 % glicerol, 100 mM NaCl, 1 mM DTT y 100 mM glutamato amónico) y 5mM de ATPyS junto con 5 µM del fragmento de ADN compuesto por una cola de 50 nt (poli (T)) en el extremo 5', seguido de una parte de 16 bp que comprende el sitio de corte de la enzima de restricción EcoRI y biotinilado en el extremo 3'. La sonda de ADN fue producto de la hibridación del oligonucleótido *Biotinilado-EcoRI* (5'-BtdT-CCCCGAATTCCTTTT TT-3') con el oligonucleótido *EcoRI complementario* (5'-GGGGGGAATTCGGGGG-3'). La reacción de unión a ADN y hexamerización de BcMCM (o GST-BcMCM) se llevó a cabo a 4° C durante 16 h. Posteriormente, la muestra se incubó con 50 µL de bolas magnéticas, “Dynabeads® M280 Streptavidin” (Invitrogen), previamente lavadas y equilibradas en el tampón de lavado (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM Mg(oAc)₂, 5 % glicerol, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 100 mM glutamato amónico y 0,02 % NP-40), durante una hora a 4° C con agitación. Tras la incubación, se realizaron tres lavados con el tampón de lavado antes de eluir el complejo hexamérico unido al ADN. La elución se realizó mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI (Fermentas) durante 30 minutos a 30° C. En paralelo, como control negativo, se llevó a cabo el mismo ensayo pero sin añadir el ADN biotinilado a la reacción (Figura 3.1).



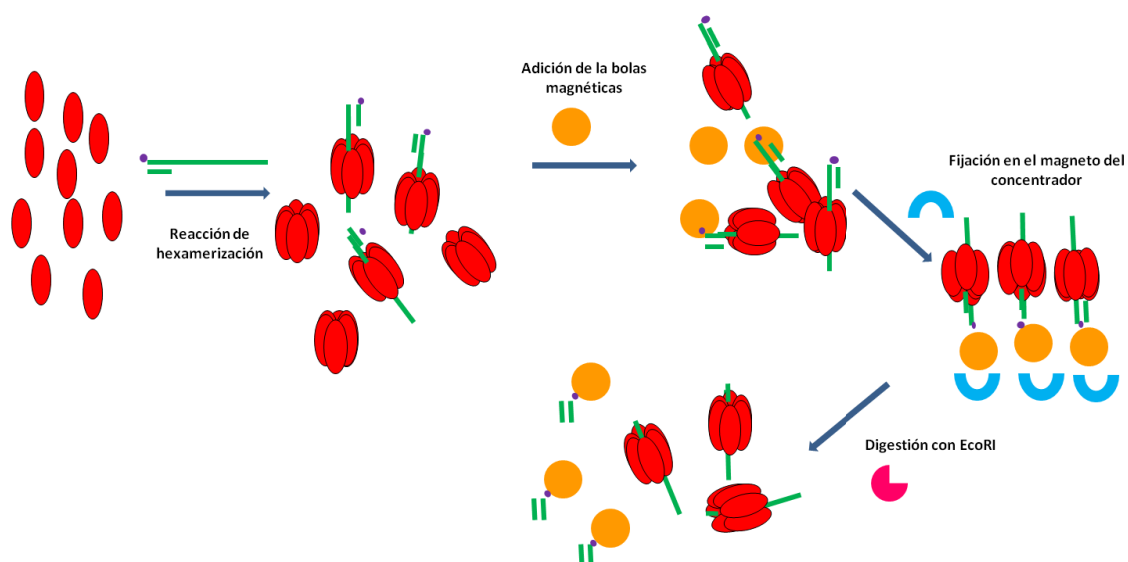


Figura 3.1. Representación esquemática de la purificación del complejo hexamérico BcMCM o GST-BcMCM en presencia de ADN. Primero, se incubó en las condiciones de hexamerización la proteína monomérica con el ADN hibridado. Tras la incubación, se añadieron las bolas magnéticas de estreptavidina y se fijaron con el concentrador “DynaMag™-2 Magnet” (Invitrogen) a un magneto, separando los hexámeros no unidos al ADN. Los distintos elementos de la reacción se representan mediante figuras: las proteínas monoméricas de BcMCM o GST-BcMCM (rojo); la sonda de ADN hibridado (verde); el marcaje de biotina (verde); estreptavidina acoplada a las bolas magnéticas (naranja); el magneto (azul); la enzima EcoRI (rosa). Se muestra una breve explicación de los pasos.

3.7.2. Complejos de BcMCM con ADN marcado con oro

El oligonucleótido *biotinilado-EcoRI* hibridado con *EcoRI* complementario (mostrado en la sección 3.7.1.) se marcó con moléculas de estreptavidina unidas a partículas de oro. Para el marcaje se utilizó 10 µL de ADN y 10 µL de las partículas comerciales de estreptavidina-oro “Gold Conjugate de 5 nm” (B. B. International). La mezcla de ADN biotinilado y partículas de estreptavidina-oro se incubó una hora a 25° C produciéndose una interacción específica entre la biotina del ADN y la estreptavidina de las partículas de oro. Posteriormente, se añadió 20 µL de las bolas magnéticas con estreptavidina “Dynabeads® M280 Streptavidin” (Invitrogen) para eliminar de la reacción el ADN biotinilado no marcado con oro, incubando otra hora a 25° C con agitación. Para separar los oligonucleótidos marcados con oro de los no marcados, se usó el concentrador de partículas magnéticas “DynaMag™-2 Magnet” (Invitrogen) y se recogió el sobrenadante que contenía la muestra de ADN pura marcada con oro. El sustrato ADN-oro obtenido se utilizó para formar complejos hexaméricos de BcMCM-ATPγS-ADN en el tampón de hexamerización (20 mM Tris-HCl pH7,5, 10 mM Mg(OAc)₂, 10 % glycerol, 100 mM NaCl,

1 mM DTT y 100 mM glutamato amónico) con 5 mM de ATPγS y 3 μM de BcMCM. La reacción se incubó a 4° C durante 16 h, antes de observarlo en el microscopio electrónico.

3.7.3. Obtención de imágenes

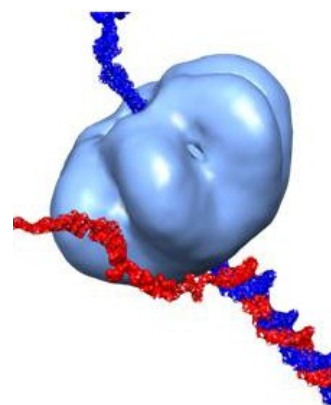
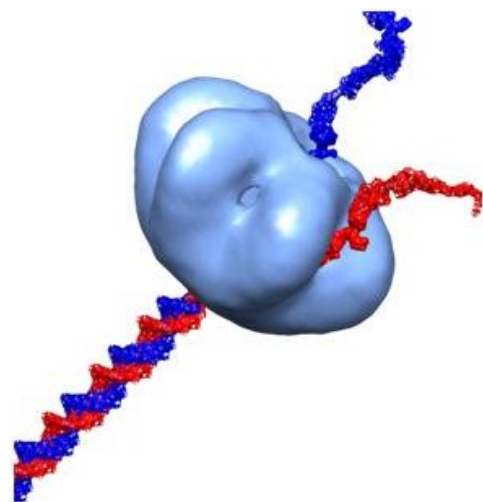
Para la tinción negativa, los distintos complejos hexaméricos de BcMCM fueron diluidos hasta una concentración aproximada de 0,15 mg/mL. Los complejos analizados fueron los formados por BcMCM en presencia de ATPγS (BcMCM-ATPγS), con ATPγS y ADN (BcMCM-ATPγS-ADN), hexámeros de BcMCM en presencia del nucleótido ADP (BcMCM-ADP) y el complejo de la proteína con etiqueta seis histidinas-GST en su N-terminal, GST-BcMCM, formado en presencia de ATPγS y ADN (GST-BcMCM-ATPγS-ADN). A las rejillas de cobre/rodio cubiertas con una fina capa de carbón se les aplicó una descarga iónica durante 30 segundos. La descarga provoca que la película de carbón se haga más hidrófila y favorezca la fijación de la muestra a la superficie de la rejilla. Tras la descarga, la rejilla se incubó con 3-5 μl de muestra durante un minuto y medio. La muestra no pegada a la superficie se retiró con la ayuda de un papel de filtro (Albet), de manera que únicamente quedara una película de muestra sobre la rejilla. A continuación, la rejilla se lavó dos veces con agua MilliQ y de nuevo se retiró el exceso de solución con papel de filtro. La rejilla se tiñó negativamente incubando un minuto y medio con 2 % (p/v) de acetato de uranilo y se dejó secando al aire. Las rejillas se observaron mediante un microscopio electrónico “Tecnai G2 Spirit” (FEI, Holanda) con voltaje de aceleración de 120 kV. En el caso de las muestras BcMCM-ATPγS y BcMCM-ATPγS-ADN, las imágenes se obtuvieron utilizando películas Kodak SO163 con el microscopio electrónico JEOL-1230, trabajando a un voltaje de 100 kV y una magnificación nominal de 30.000 aumentos. Se tomaron micrografías con el porta-muestras del microscopio a 0° e inclinado a 20° y 30°, para aumentar la cobertura angular durante la reconstrucción tridimensional (3D). Las micrografías se digitalizaron utilizando un escáner “MINOLTA Dimage Scan Multi Pro” a 2400 dpi, para obtener una ventana de muestreo final de 3,5 Å/pixel. En cambio, para los complejos BcMCM-ADP y GST-BcMCM-ATPγS-ADN, las imágenes se obtuvieron utilizando una cámara “TemCam-F416” de 4kx4k pixeles (TVIP GmbH, Gauting, Alemania) a la magnificación de 28.680 aumentos y con una ventana de muestreo final de 3,75 Å/pixel.



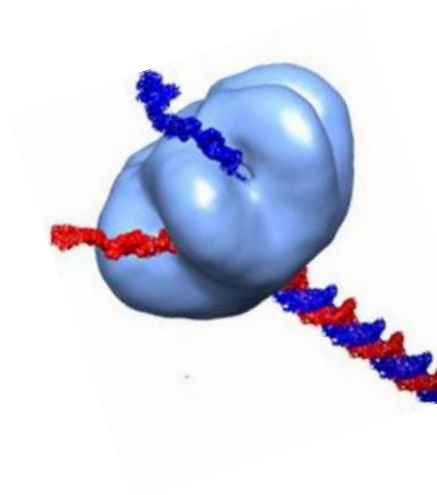
3.7.5. Reconstrucción tridimensional (3D) de los complejos

De cada experimento se extrajeron varios miles de partículas individuales de las micrografías o de las imágenes de la cámara digital y se procesaron en dos y tres dimensiones. Inicialmente, las partículas se seleccionaron utilizando el programa “Boxer” del paquete informático EMAN (Ludtke et al, 1999). A continuación, las imágenes se normalizaron a media 0 y desviación típica 1 (comando *proc2d*) y se centraron. Por último, las partículas se filtraron utilizando un filtro pasa-altas (comando *proc2d*). Las partículas preparadas de esta manera se analizaron inicialmente utilizando un algoritmo de alineamiento libre de patrón y el método de clasificación de los paquetes informáticos EMAN y XMIPP. La clasificación de redes neuronales y el análisis de la simetría rotacional del set de datos se realizaron mediante el procesamiento con XMIPP (Sorzano et al, 2004). Se generó un volumen inicial para el posterior refinamiento, utilizando el programa “startscym” del paquete EMAN (Ludtke et al, 1999), al cual se le aplicó simetría seis (C6). El proceso de refinamiento angular iterativo se llevó a cabo utilizando el comando *refine* del paquete informático EMAN (Ludtke et al, 1999). Durante el procesamiento de las imágenes varios parámetros fueron ajustados para excluir todas aquellas partículas que no eran consistentes con los volúmenes. En el último paso de refinamiento, las proyecciones del volumen se correlacionan bien con el promedio de las clases. La resolución de los mapas tridimensionales fue estimada utilizando “Fourier Shell Correlation” y un valor de corte de 0,5 durante el cálculo. La resolución estimada para BcMCM-ATPγS, BcMCM-ATPγS-ADN y GST-BcMCM-ATPγS-ADN, fue de 28 Å, 30 Å y 31 Å respectivamente.





4. Resultados



4.1. Clonaje, expresión y purificación de BcMCM recombinante

4.1.1. BcMCM recombinante es una proteína soluble y monomérica in vitro

El gen que codifica BcMCM (BC1863) se encontró mediante métodos computacionales durante una búsqueda de homólogos de MCMs en la base de datos de genomas de arqueos-eucariotas (Iyer et al, 2005; McGeoch & Bell, 2005). Este gen está integrado en el genoma bacteriano de *B. cereus* (ATCC14579) como un marco de lectura abierto (Ivanova et al, 2003). El gen BC1863 proviene del fago phBC6A51 y está localizado en una unidad policistónica de transcripción inmediatamente anterior al gen de la polimerasa del fago. La proteína BcMCM se caracteriza por poseer una estructura atípica que contiene un dominio que recuerda a la subunidad catalítica de la ADN primasa de eucariotas/arqueas en el N-terminal y otra parte homóloga a helicasa que contiene el dominio AAA+ característico de las MCM, en el C-terminal. El peso molecular de la proteína es de 117 kDa, de los cuales 40 kDa pertenecen al dominio primasa y 58 kDa al dominio helicasa. La secuencia central situada entre ambos dominios carece de actividad enzimática, pero puede tratarse de una especie de conector entre ambos dominios, parecido al “linker” de la primasa-helicasa T7 (Toth et al, 2003).

El gen que codifica la proteína BcMCM se clonó mediante RT-PCR en el vector pETM30. El clonaje se diseñó de tal modo que el ADN codificante se insertó en el marco de lectura apropiado para que exprese fusionado al extremo N-terminal de la proteína una cola de seis histidinas unida a la glutatión-S-transferasa (GST), además de un sitio de corte para la proteasa del virus jaspeado del tabaco (TEV). La expresión de la proteína se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21 STAR, obteniendo una parte de la proteína en la fracción soluble. Tras lisar las células por sonicación en el tampón de lisis (Sección 3.2.1. de Materiales y Métodos) y una centrifugación para eliminar la parte no soluble de la muestra, se realizó un primer paso de captura en la purificación mediante una cromatografía de afinidad (*GSTrap Hp* de 5 mL, GE Healthcare). Tras un cambio de tampón, se eliminó la doble etiqueta mediante la digestión con la proteasa TEV. Después, se realizó una segunda cromatografía de afinidad, pero esta vez mediante una *Histrap HP* (GE Healthcare), para separar la fracción digerida de la no digerida. Como último paso de purificación, se aplicó la muestra en una columna de filtración en gel (*Superdex 200 16/60 PG*, GE Healthcare) para la obtención de una mayor pureza y homogeneidad de la proteína (Figura 4.1A).



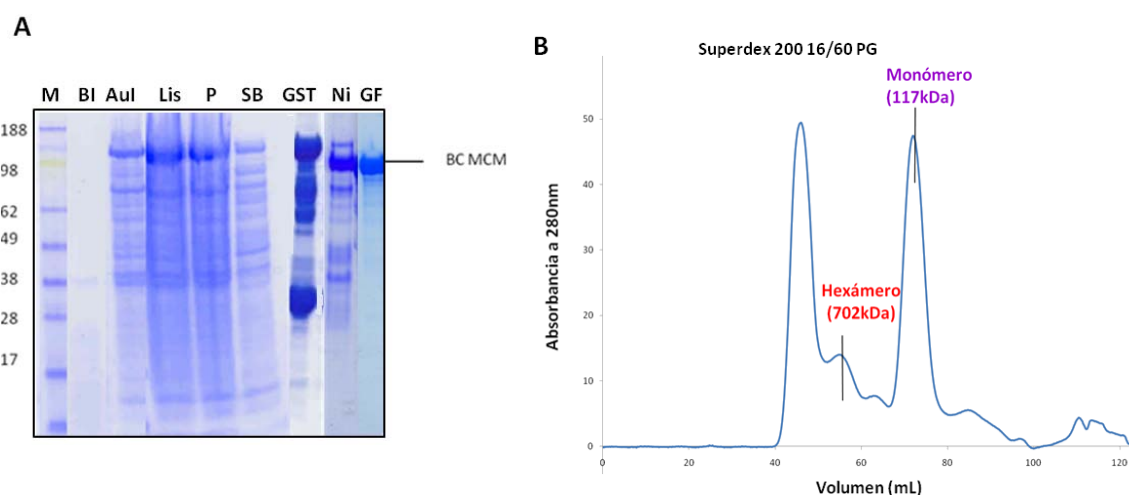


Figura 4.1. Expresión y purificación de BcMCM. A.

Los distintos pasos de purificación de BcMCM fueron analizados mediante SDS-PAGE de 4-12 %. La primera calle M corresponde al marcador de peso molecular. La calle BI y Aul corresponde a una muestra de cultivo previo a la expresión y una vez realizada la auto-inducción tras la incubación de 16 h. Las calles Lis, P y SB son las obtenidas tras el test de solubilidad, correspondiendo a la muestra tras la lisis, el sedimento obtenido tras centrifugar el lisado y el sobrenadante correspondiente a la parte soluble, respectivamente. GST es la muestra recogida en la elución de la primera cromatografía

de afinidad *GSTrap*. La muestra obtenida de la columna *Histrap* corresponde a la calle Ni y la calle GF muestra la fracción monomérica tras la columna de filtración. Se aprecia el cambio en el peso molecular tras el segundo paso cromatográfico donde la proteína recombinante ya no tiene la etiqueta His-GST fusionada en la parte N-terminal. **B.** Cromatograma de la columna de gel filtración *Superdex 200*. Los picos de elución pertenecientes a los distintos estados oligoméricos y el peso molecular correspondiente de cada pico aparecen señalizados. **C.** Análisis mediante SDS-PAGE de 4-12 % de las fracciones recogidas en la gel filtración. La calle M corresponde al marcador de peso molecular, indicando a la izquierda los pesos moleculares. La calle L corresponde a la muestra cargada en la columna cromatográfica. El resto de las calles contienen las distintas fracciones recogidas en los principales picos de elución pertenecientes a las distintas formas oligoméricas de BcMCM. Se analizaron 15 μ L de 2 mL de cada muestra.

El perfil cromatográfico de la columna de filtración en gel mostró varios picos a distintos volúmenes de elución, incluyendo un pico de agregados de elevado peso molecular. Estos agregados pueden deberse en parte a los complejos formados entre BcMCM con y sin etiqueta y por el efecto de la dimerización de la GST, que puede hacer que se formen complejos superiores. El análisis de SDS-PAGE de los picos de elución revelaron la presencia de una única

banda correspondiente al peso molecular de BcMCM, próximo a 117 kDa (Figura 4.1B y 4.1C). El pico aproximado al peso molecular de 700 kDa pertenecería a la forma hexamérica de BcMCM y el pico mayoritario, cercano a 100 kDa, se corresponde a la forma monomérica de la proteína. Las fracciones correspondientes al monómero de BcMCM fueron las utilizadas para su posterior estudio biofísico, bioquímico y estructural. Previamente ya se había descrito el aislamiento de la proteína BcMCM en forma monomérica (Samuels et al, 2009).

La proteína con etiqueta, GST-BcMCM, se purificó en las mismas condiciones que BcMCM, pero utilizando dos únicos pasos cromatográficos: una columna de afinidad *Histrap* y una filtración en gel *Superdex 200 16/60*, en la que se obtuvo un pico mayoritario de la forma monomérica de GST-BcMCM (149 kDa).

4.1.2. La BcMCM recombinante forma hexámeros en presencia de ADN

El cromatograma de la filtración en gel, además del pico principal de la forma monomérica, mostró un pequeño pico perteneciente a un estado oligomérico de BcMCM. El peso molecular aparente del pico fue aproximadamente de 700 kDa, peso que concuerda con el complejo hexamérico de BcMCM (702 kDa). El supuesto oligómero se analizó utilizando diferentes métodos, cuyos resultados confirmaron la presencia del complejo hexamérico BcMCM unido a fragmentos de ADN, que en este caso provienen de *E. coli*. Para confirmar la presencia de ADN en este hexámero, se realizaron tres ensayos diferentes. En primer lugar, se analizó la relación de la absorbancia de la muestra a 260 nm/280 nm, posteriormente, se realizó un ensayo de espectro de CD y por último, se llevó a cabo una extracción y purificación del ADN endógeno. El estudio de la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop. El valor de la relación 260/280 para la muestra hexamérica fue de 1,1, mientras que para la monomérica fue de 0,54 (Figura 4.2A). Generalmente, para que la muestra proteica este pura y en ausencia de ADN, la relación de la absorbancia a 260 nm/280 nm debe ser de un valor entre 0,5-0,6, por lo tanto, el valor de relación 260/280 = 1,1 indica la presencia de ácidos nucleicos.

El análisis del espectro de CD realizado entre 200-350 nm mostró un pico a una longitud de onda de 260 nm, propio del ADN (Figura 4.2B). Este pico no debe confundirse con las bandas que señalan la presencia de estructura terciaria: entre 250-270 nm en el caso del residuo de Fenilalanina, 270-290 nm para la Tirosina, y por último, entre 280-300 nm para el Triptófano.



Mediante el proceso de extracción con fenilcloroformo y precipitación con etanol, se consiguió obtener ADN a partir de la fracción oligomérica aislada, a una concentración de 272,6 ng/ μ L. Este ADN se utilizó para su posterior caracterización con el fin de conocer más detalladamente el tipo de ADN que une el complejo BcMCM.

Los tres métodos empleados confirmaron la presencia de ADN en la muestra del pico, de la columna de gel filtración, correspondiente a la forma hexamérica de BcMCM. A pesar de purificar mayoritariamente la forma monomérica de BcMCM, la pequeña fracción hexamérica purificada plantea la posibilidad de que parte de BcMCM se encuentre en la célula formando complejos hexaméricos, pudiendo ser esta la forma activa. En eucariotas, a pesar de que la forma que muestra actividad helicasa es el complejo heterohexamérico Mcm2-7, las MCMs en parte también se pueden encontrar aisladas (Forsburg, 2004).

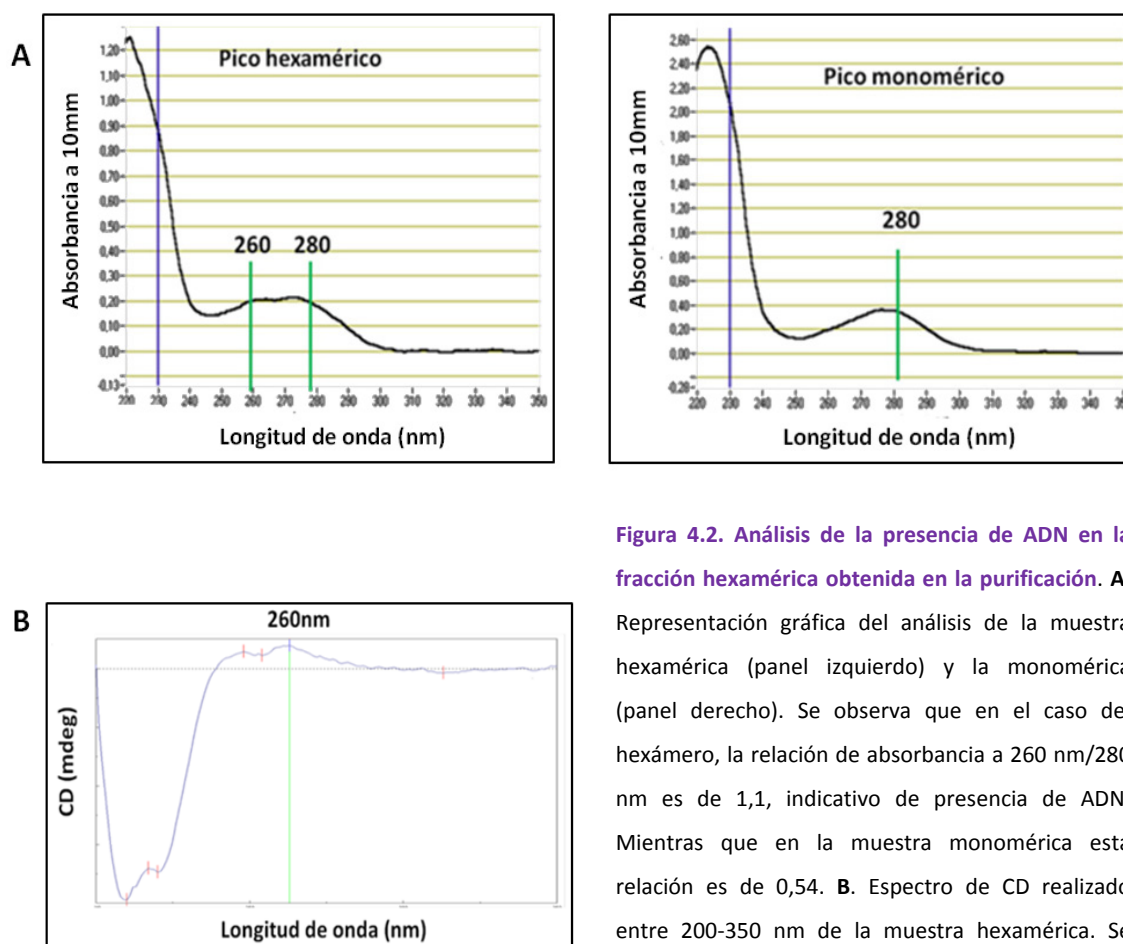


Figura 4.2. Análisis de la presencia de ADN en la fracción hexamérica obtenida en la purificación. **A.**

Representación gráfica del análisis de la muestra hexamérica (panel izquierdo) y la monomérica (panel derecho). Se observa que en el caso del hexámero, la relación de absorbancia a 260 nm/280 nm es de 1,1, indicativo de presencia de ADN. Mientras que en la muestra monomérica esta relación es de 0,54. **B.** Espectro de CD realizado entre 200-350 nm de la muestra hexamérica. Se observa un pico próximo a 260 nm perteneciente al ADN.

4.1.3. Caracterización del ADN co-purificado con el hexámero

El ADN extraído y purificado se caracterizó con el objetivo de conocer su longitud y su naturaleza, ssADN o dsADN. Se analizó el tamaño del ADN mediante un análisis electroforético en geles de 4 % de agarosa. Para ello, además de un marcador de ADN de bajo peso molecular, se utilizaron varios oligonucleótidos de distintos tamaños como referencia, con el fin de afinar el análisis. La mayoría de los oligonucleótidos seleccionados eran poli (T), pero también se utilizó el oligonucleótido *HA_strep-bubble* de 96 nt capaz de formar estructuras secundarias internas (ver Materiales y Métodos sección 3.3.4.1.). Tras la electroforesis, el gel de agarosa se tiñó con “SYBR GOLD” (Invitrogen). Este tinte fluorescente de alta sensibilidad es capaz de detectar ácidos nucleicos tanto de cadena sencilla como de doble cadena. La banda de ADN co-purificado no mostró una banda discreta de un determinado número de bases, sino un grupo heterogéneo cuyo tamaño oscilaba entre 150-200 nt (Figura 4.3A).

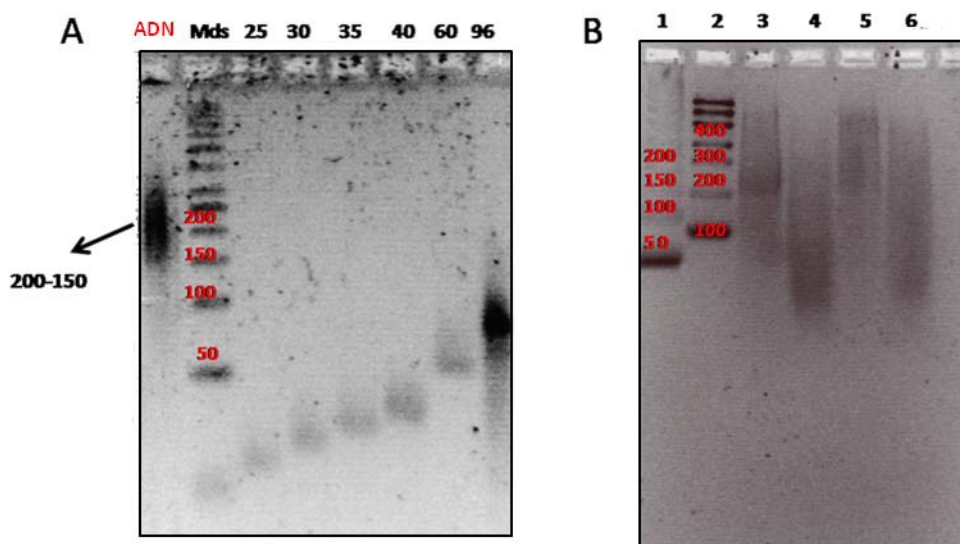


Figura 4.3. Caracterización del tamaño y naturaleza del ADN co-purificado. **A.** Gel de agarosa del 4 %. La calle ADN es el ADN co-purificado con el complejo. Mds contiene la calle con los marcadores de doble cadena de ADN. Las calles 25, 30, 35, 40, 60 muestran los oligonucleótidos poli (T) usados como referencia de tamaño y la calle 96 contiene el oligonucleótido *HA_strep-bubble* que tiende a formar estructuras secundarias. La muestra de ADN co-purificada ha sido marcada en rojo. **B.** Gel de agarosa al 4 % para analizar la naturaleza del ADN co-purificado. Las calles hacen referencia a: 1, marcador de doble cadena “50 bp marker”; 2, marcador de ARN “low range RNA ladder”; 3, ADN endógeno; 4, ADN digerido primero con MB y luego con T7 endonucleasa; 5, digestión con MB y 6, digestión con T7 endonucleasa.

Para clarificar la naturaleza de la cadena del ADN, la muestra fue digerida con dos enzimas: la endonucleasa T7 (T7) y la nucleasa MungBean (MB). T7 es capaz de digerir ADN de doble cadena que no está perfectamente emparejado, estructuras tipo “Holiday”, cruciformes y de



cruce. En cambio, MB es una nucleasa específica para ADN y ARN de cadena sencilla. Los resultados de la digestión se resolvieron en geles del 4 % de agarosa teñido con “SYBR GOLD”. Se aprecia cambio de movilidad únicamente en la digestión doble con MB y T7 y en la digestión con T7 sola (Figura 4.3B). El resultado de este experimento no definió la naturaleza del ADN co-purificado. En el caso de que este ADN contenga secciones de dsADN y de ssADN, tras el tratamiento de la muestra con MB, todas las cadenas sencillas deberían digerirse quedando solo ADN de doble cadena con extremos romos. En la doble digestión, el producto tratado con MB fue sometido con la endonucleasa T7, la cual no es capaz de digerir dsADN con extremos romos. Cabe la posibilidad de que el ADN co-purificado —de un tamaño entre 150-200 nt— sea de cadena sencilla pero que dada su longitud forme estructuras secundarias. De esta manera, este ADN sería una diana sensible a la digestión de la endonucleasa T7.

4.2. Caracterización biofísica de BcMCM

4.2.1. BcMCM es estable, monomérica, homogénea y monodispersa en solución

En el proceso de purificación, tras la columna de gel filtración, se obtuvieron varias poblaciones de distintas formas oligoméricas de BcMCM. El equilibrio existente entre estas especies oligoméricas desaparece al separar las fracciones homogéneas de cada oligómero. Una vez obtenida la proteína en su forma monomérica, no se detectó su asociación que daría lugar a otros oligómeros.

La homogeneidad del monómero se analizó mediante geles de poliacrilamida en condiciones nativas, donde se apreció una intensa banda correspondiente al peso molecular aproximado de 100 kDa; y mediante ultracentrifugación analítica, gracias a la cual se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación de la muestra a 25° C. El análisis de los datos mostró unos valores de coeficiente de sedimentación correspondientes a una molécula de peso molecular aproximado de 105 kDa, consistente con el peso molecular del monómero BcMCM. Además, estos valores correspondían a un 99,5 % de la muestra, siendo prácticamente la única especie presente en la solución (Figura 4.4A).

El estado de oligomerización y la monodispersidad de la muestra fue evaluada mediante DLS a 4° C (ver Materiales y Métodos sección 3.4.3.). En el análisis de la dispersión dinámica de la luz BcMCM presenta un único estado oligomérico con un índice de polidispersidad del 21,5 % (Figura 4.4B). El resultado de este análisis se caracteriza por presentar una sola especie con

un peso molecular de 174 kDa, que se ajusta de una manera razonable al peso molecular teórico de la proteína BcMCM en su estado monomérico (117 kDa).

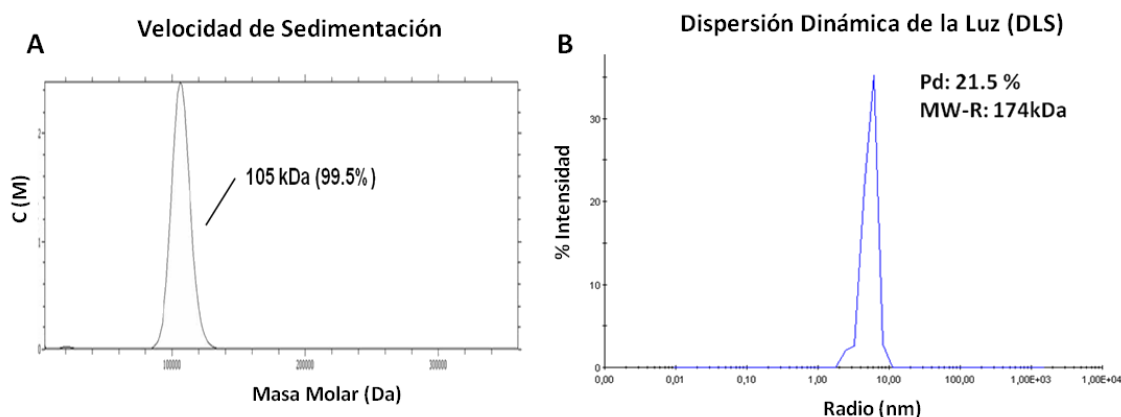


Figura 4.4. Análisis de la homogeneidad y polidispersidad del monómero BcMCM. **A.** Representación gráfica de los resultados del experimento de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica. Datos obtenidos con una cubeta de 1,2 mm OD_{280nm} a 25° C. **B.** Análisis de DLS a 4° C, indicando el valor de peso molecular (MW) y de polidispersidad (% Pd).

4.2.2. La BcMCM recombinante está plegada y presenta estructura secundaria y terciaria

Una vez aislada la proteína BcMCM con una buena pureza, se realizaron los estudios necesarios para obtener información acerca de su estado de plegamiento y de la homogeneidad de la muestra, como paso previo a los análisis estructurales. La estructura secundaria de BcMCM se analizó mediante un espectro de CD en el ultravioleta lejano. El espectro de CD obtenido a 4° C mostró una curva característica de las proteínas con una estructura secundaria de tipo helicoidal, con dos mínimos a 220 nm y 208 nm (Figura 4.5A). La predicción realizada mediante el servicio informático “PSIPRED Protein Structure Prediction server” (<http://www.psipred.net/psiform.html>) (McGuffin et al, 2000) confirmó la prevalencia de estructuras secundarias en forma de hélice en la proteína BcMCM.



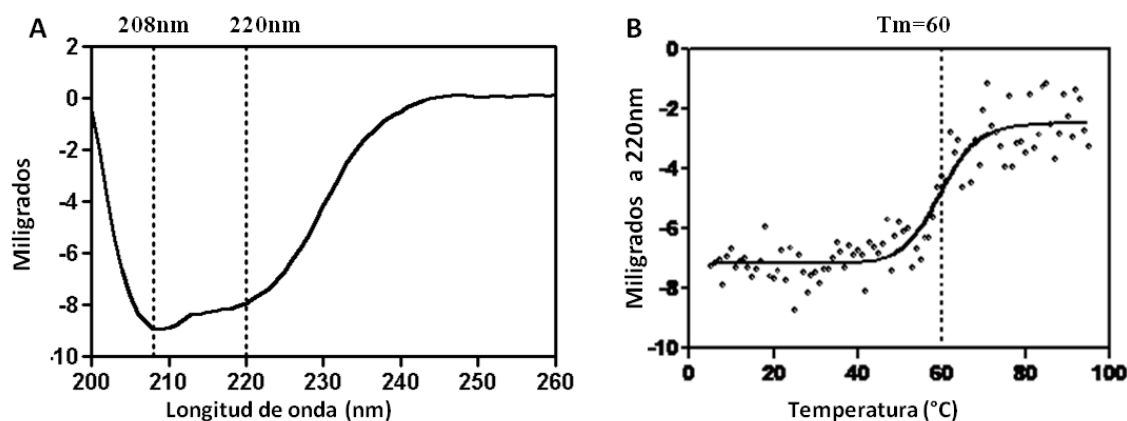


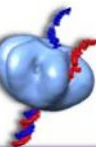
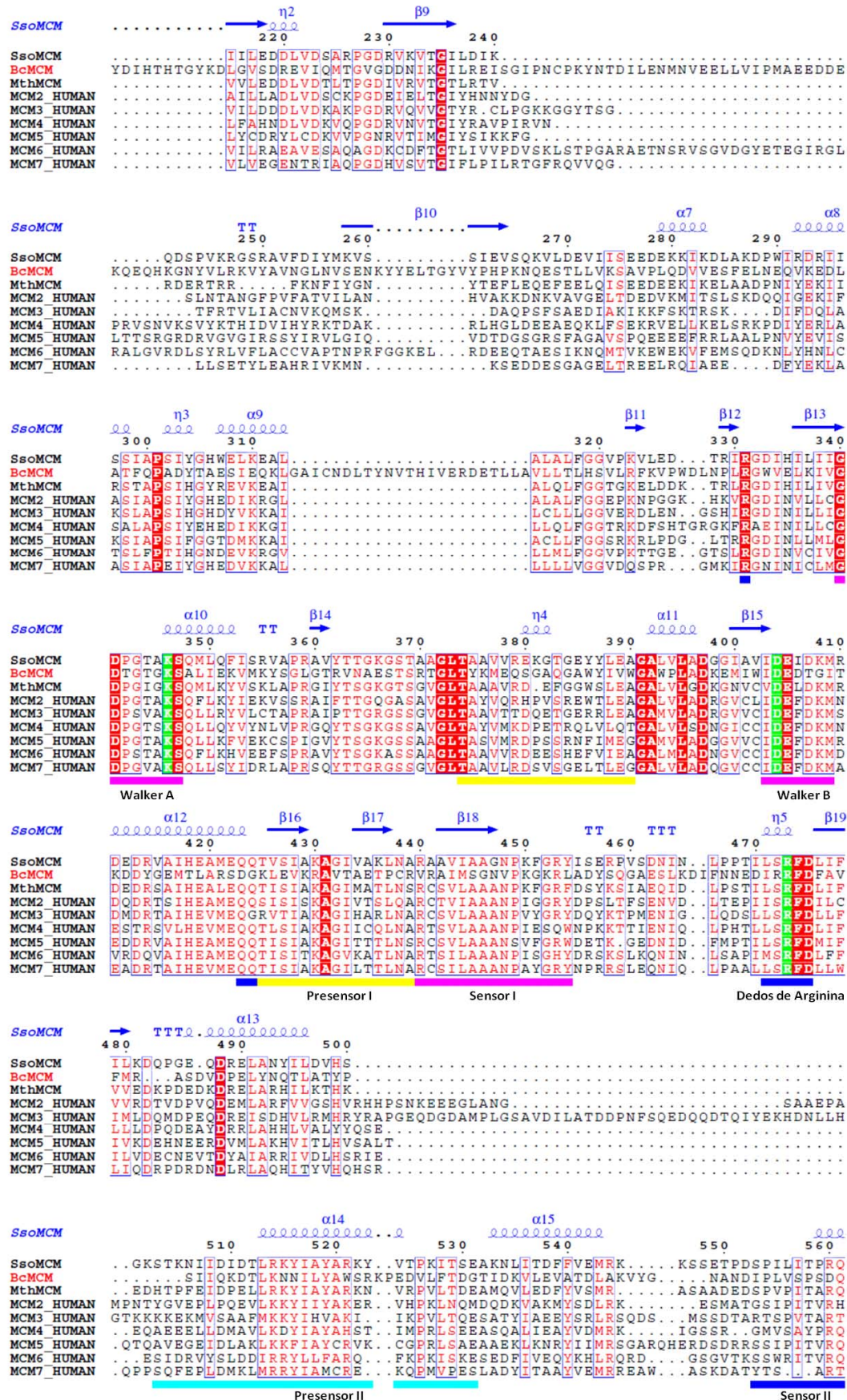
Figura 4.5. Espectro de CD y de desnaturalización térmica de BcMCM. Las medidas se llevaron a cabo en una cubeta de 0,2 cm de paso óptico. **A.** Espectro de CD realizado entre 260 nm y 200 nm. **B.** Desnaturalización térmica de la proteína realizada variando la temperatura de 4° C a 95° C. La medida se monitorizó a una longitud de onda de 220 nm.

El estudio de desnaturalización térmica reveló la existencia de estructura terciaria en la proteína recombinante. El espectro obtenido reveló una curva sigmoidea con un cambio en la elipticidad de la proteína a una temperatura media de desnaturalización (T_m) de aproximadamente 60° C (Figura 4.5B).

4.3. Proteínas mutantes del centro catalítico AAA+ ATPasa

4.3.1. Subclonaje y expresión de los mutantes Walker A (K653A), Walker B (D711A) y “dedo de Arginina” (R782A)

Mediante un alineamiento basado en la estructura cristalográfica de SsoMCM (PDB 3F9V) con el programa Clustal X (Larkin et al, 2007) y el programa ESPript 2.2 (esprpt.ibcp.fr) (Gouet et al, 1999) se comparó la secuencia de la BcMCM con las MCM de arqueas (SsoMCM y MthMCM), además de con las seis MCM humanas que forman el complejo Mcm2-7. BcMCM tiene cierta homología con todas las MCM humanas. Todas ellas poseen el centro catalítico en el dominio AAA+ muy bien conservado, manteniendo intactos todos los residuos funcionales (Koonin, 1993) (Figura 4.6).



Resultados

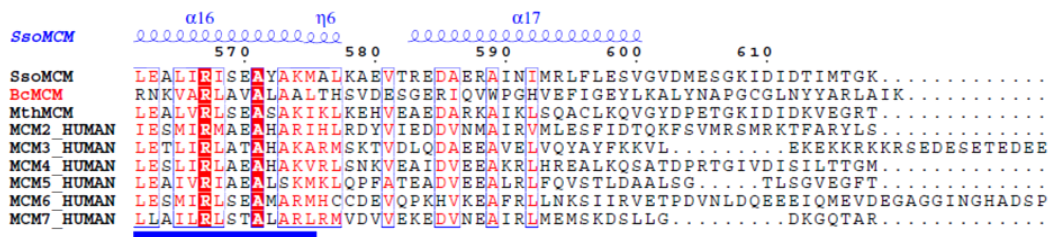


Figura 4.6. Alineamiento de secuencias de las proteínas MCM de arqueas (SsoMCM y MthMCM), las seis MCM humanas del complejo MCM2-7 y BcMCM basado en la estructura de SsoMCM. Se muestra la parte alineamiento de las regiones conservadas del dominio AAA+ ATPasa. En la parte superior se representa la estructura secundaria de la proteína SsoMCM en color azul oscuro. En la parte inferior de la alineación se señalan los motivos con distintas tonalidades: los motivos catalíticos *cis* en morado, los motivos que actúan en *trans* en azul oscuro, las horquillas β en amarillo y el motivo presensor II en azul claro. Los residuos mutados en los motivos Walker A (K653A), Walker B (D711A) y “dedo de Arginina” (R782A) se destacan en verde claro.

Para analizar el mecanismo de hidrólisis de ATP, así como la influencia de la unión del nucleótido en el estado de oligomerización, se llevaron a cabo mutaciones puntuales en algunos residuos comprendidos en los motivos catalíticos Walker A, el cual afecta la asociación con ATP (K653A), y Walker B, que interviene en su catálisis (D711A) (Erzberger & Berger, 2006). Además se llevó a cabo la mutación R782A que abole la función catalítica realizada por el “dedo de Arginina” entre subunidades (Hanson & Whiteheart, 2005).

La obtención de estos mutantes se llevó a cabo mediante el método de la mutagénesis dirigida, siguiendo las instrucciones del fabricante (mirar Materiales y Métodos en la sección 3.1.2.). Una vez secuenciados los mutantes, se expresaron siguiendo el mismo método que la proteína silvestre. Los tres mutantes fueron solubles aunque la cantidad de proteína expresada varió de un mutante a otro. El mutante K653A mostró unos niveles de expresión similares al de la proteína silvestre, mientras que las mutantes R782A y D711A se obtuvieron en menor cantidad.

4.3.2. Purificación de los mutantes K653A, D711A y R782A

Las construcciones de las tres proteínas mutantes conservan la misma estructura de la BcMCM-pETM, conteniendo en la parte N-terminal la etiqueta de seis histidinas y GST, seguido del sitio de corte de la proteasas TEV.

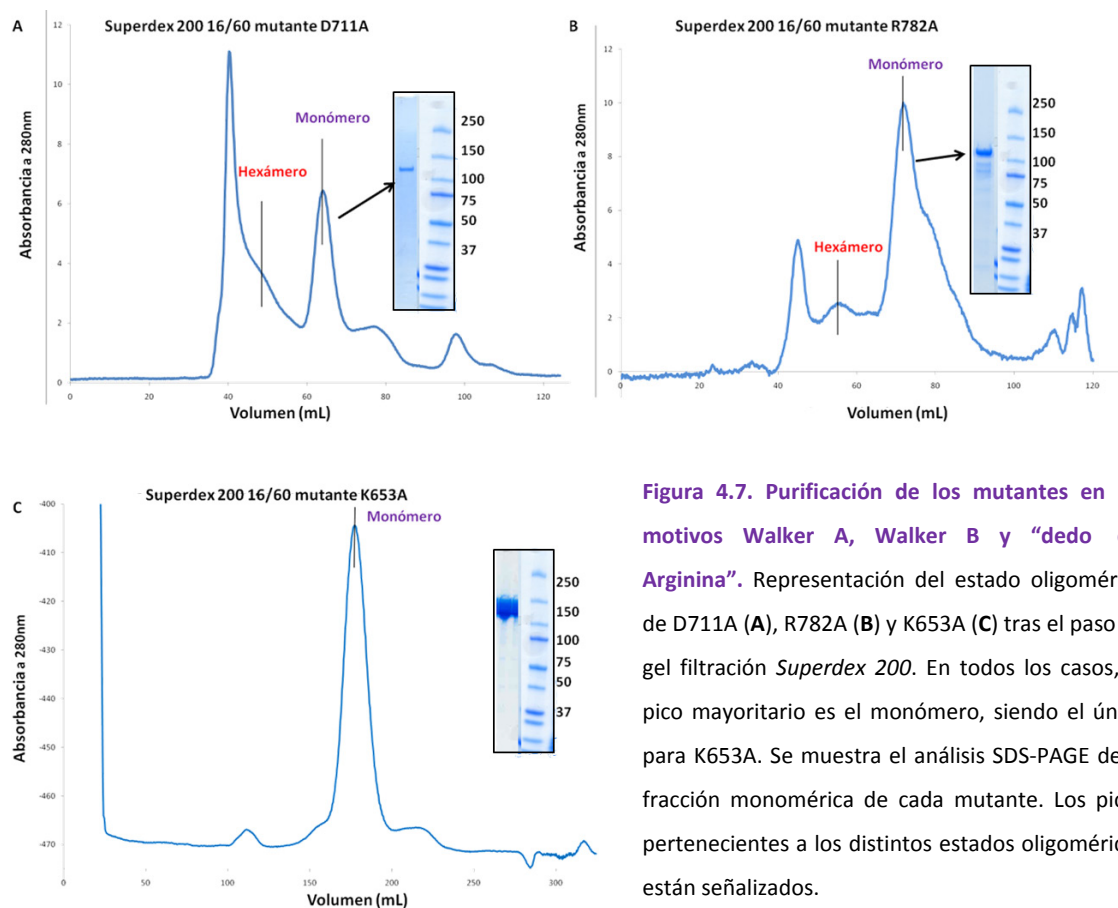


Figura 4.7. Purificación de los mutantes en los motivos Walker A, Walker B y “dedo de Arginina”. Representación del estado oligomérico de D711A (A), R782A (B) y K653A (C) tras el paso de gel filtración *Superdex 200*. En todos los casos, el pico mayoritario es el monómero, siendo el único para K653A. Se muestra el análisis SDS-PAGE de la fracción monomérica de cada mutante. Los picos pertenecientes a los distintos estados oligoméricos están señalizados.

La purificación de los mutantes se realizó siguiendo el mismo protocolo empleado con anterioridad para la BcMCM silvestre. El perfil cromatográfico de la cromatografía de exclusión fue diferente para el mutante K653A, donde se observó un único pico que se corresponde al tamaño del monómero. En los mutantes D711A y R782A se observó un pico menor, a un peso molecular aparente de 700 kDa, correspondiente a la forma hexamérica. El comportamiento de D711A y R782A recuerda al de la proteína silvestre BcMCM (Figura 4.7), en la que además del pico mayoritario del monómero se observa un pico de menor intensidad perteneciente a la forma hexamérica.

4.4. Subclonaje, expresión y purificación de los dominios primasa y helicasa aislados

4.4.1 El dominio primasa BcMCM¹⁻³⁶¹

La proteína BcMCM posee en la parte N-terminal un dominio primasa con baja homología a la subunidad catalítica de las ADN primasas de arqueas y eucariotas (Iyer et al, 2005). En la carta escrita por McGeoch y Bell en 2005 sobre el descubrimiento del gen que codifica la



proteína BcMCM (McGeoch & Bell, 2005), se representa gráficamente la predicción de dominios de BcMCM, indicando la localización de cada dominio y sus subunidades catalíticas. En esta representación el dominio primasa se localiza entre los primeros 200 aminoácidos de la proteína, con su centro catalítico de Aspartato y el sitio de unión de NTP. Utilizando esta información y siguiendo las predicciones obtenidas mediante los programas bioinformáticos PONDR (www.pondr.com) y PROSITE (expasy.org) se diseñó la construcción del dominio primasa BcMCM¹⁻³⁶¹, que contiene los primeros 361 aminoácidos de la proteína.

Para facilitar la purificación del dominio primasa, se agregó en el N-terminal de la proteína una cola de seis histidinas seguida de un sitio de corte para la TEV. La proteína recombinante BcMCM¹⁻³⁶¹ se expresó en células de *E. coli* Rosetta, obteniendo gran parte de la proteína en la fracción soluble, que pudo utilizarse como material de partida para su aislamiento (Figura 4.8A).

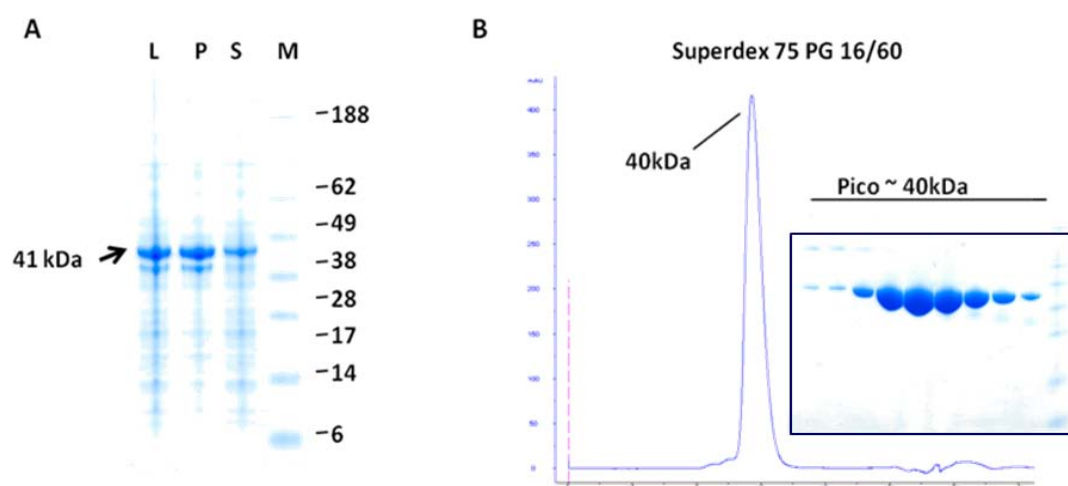


Figura 4.8. Purificación del dominio primasa BcMCM¹⁻³⁶¹. **A.** Análisis SDS-PAGE de la solubilidad del dominio primasa. La calle L corresponde a la muestra lisada, mientras que las calles P y S corresponden a la fracción sedimentada y soluble tras la clarificación por centrifugación del lisado. La calle M muestra el marcador de peso molecular “See Plus2” (Invitrogen). **B.** Cromatograma del último paso en filtración de gel de BcMCM¹⁻³⁶¹. Se muestra el análisis en SDS-PAGE de las fracciones correspondientes al pico de elución.

La purificación del dominio primasa se inició con un primer paso cromatográfico de afinidad con la columna *Histrap HP* (GE Healthcare), seguida por otra de *Heparina HP* (GE Healthcare), para lo cual hubo que diluir la muestra hasta llegar a una concentración salina adecuada (ver Materiales y Métodos sección 3.2.3.). Tras eliminar la cola de histidinas mediante digestión con la proteasa TEV, la muestra se cargó de nuevo en la columna *Histrap* con el fin de aislar la proteína digerida. En el último paso de purificación mediante filtración en gel, se empleó una columna preparativa *Superdex 75 16/60 PG* (GE Healthcare), tras la cual se

obtuvo la proteína primasa con un peso molecular correspondiente a su forma monomérica (Figura 4.8B).

4.4.2. El dominio helicasa BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹

El fragmento C- terminal de la proteína BcMCM, los últimos 529 aminoácidos, contiene el dominio AAA+ ATPasa y por tanto, es responsable de la actividad helicasa. El diseño para subclonar el dominio helicasa BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ se realizó en base a los análisis bioinformáticos de los programas PONDR (www.pondr.com) y PROSITE (expasy.org).

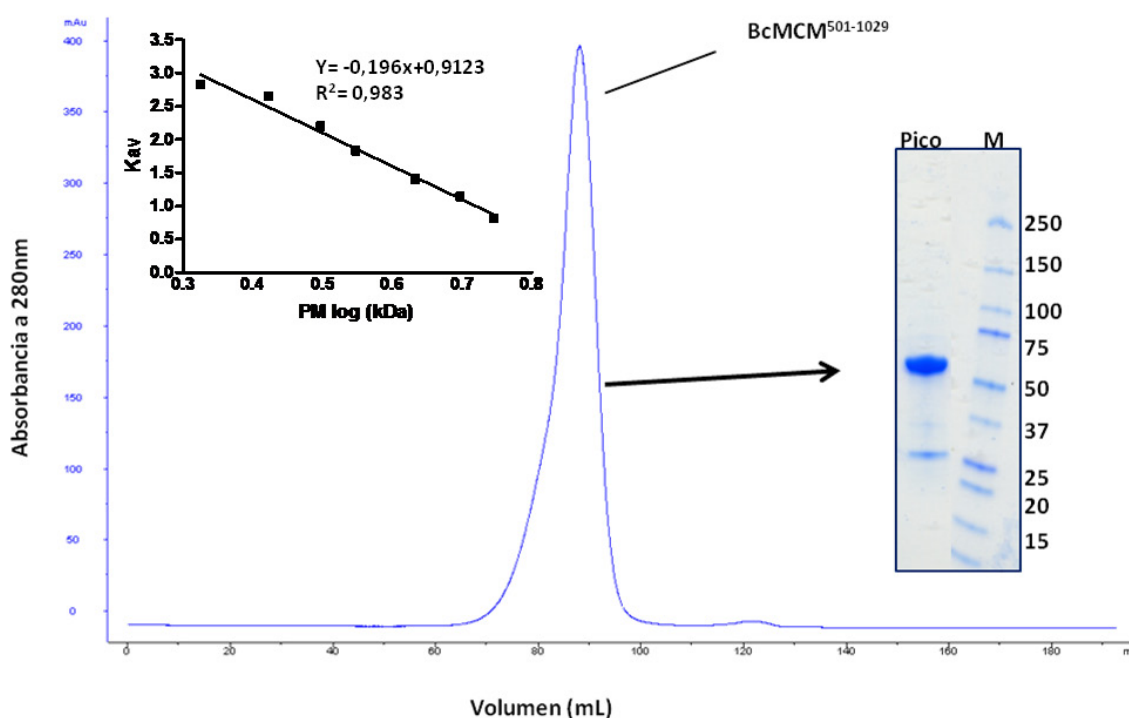


Figura 4.9. Purificación del dominio BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹. Representación del cromatograma obtenido tras la filtración en gel con la *Superose 6 16/70*. Se obtiene un único pico de un peso molecular aparente de 360 kDa, perteneciente a la forma hexamérica de la proteína helicasa (60 kDa por proteína monomérica). Se muestra el análisis de SDS-PAGE de una de las fracciones del pico junto al marcador de peso molecular. La recta de calibración de la columna aparece en la parte izquierda del pico de elución junto a la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (R^2).

BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ se subclonó y expresó en las mismas condiciones que el dominio primasa, produciendo una proteína fusionada a una cola de seis histidinas en su N-terminal para facilitar su posterior purificación. Antes de iniciar los pasos cromatográficos de la purificación, la muestra se trató con 0,25 % de polietileneimina (PEI) para eliminar los restos de ADN y con $(NH_4)_2SO_4$ para limpiar la muestra de los restos de PEI. En la purificación, se empleó el mismo protocolo que para el dominio primasa, con la diferencia de que en la columna de heparina la proteína no se unió a la resina. Se eliminó la etiqueta mediante digestión con TEV y la muestra

se cargó de nuevo a la columna de *Histrap HP*, recogiendo la elución de la carga. Esta muestra fue concentrada y cargada en una columna *Superose 6 16/70* (GE Healthcare). La banda eluída mostró un peso molecular cercano a 360 kDa, consistente con el complejo hexamérico de BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ (60 kDa por monómero) (Figura 4.9). Por lo tanto, el dominio helicasa en ausencia del dominio primasa forma un complejo hexamérico.

4.5. Caracterización bioquímica de BcMCM

4.5.1. BcMCM interacciona con ADN *in vitro*.

Para estudiar la interacción entre BcMCM y el ADN, se llevaron a cabo ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA). Éste es un método simple, sensible y rápido, que evalúa la capacidad que tiene una proteína para alterar la migración de una molécula de ADN en un gel en condiciones no desnaturalizantes (Hellman & Fried, 2007).

4.5.1.1. BcMCM une con mayor afinidad el ssADN

Generalmente, las helicasas se asocian con una mayor afinidad al ADN de cadena sencilla que al de doble cadena (Tuteja & Tuteja, 2004). Para estudiar las preferencias de BcMCM sobre el tipo de sustrato de ADN, al que la proteína es capaz de unirse, se generaron diferentes sondas de ADN que recrean diferentes intermediarios replicativos (Materiales y Métodos sección 3.5.2.). La secuencia de estas sondas proviene del genoma del bacteriófago M13. Como base se utilizó una sonda de 60 nucleótidos marcado radiactivamente en el extremo 5'. Esta sonda fue hibridada con distintos oligonucleótidos (Materiales y Métodos sección 3.5.2.). También se empleó una sonda politimidínica (poli (T)) de 40 nucleótidos.

Como se puede observar en la Figura 4.10, la BcMCM muestra una clara preferencia por el ADN de cadena sencilla, o por aquellas estructuras que poseen fragmentos de cadena sencilla libres. La interacción BcMCM-dsADN genera una banda poco intensa correspondiente al retardo causado sobre el ADN. La afinidad de BcMCM por dsADN es menor que la afinidad por los sustratos que contienen ssADN (Figura 4.10). En la unión con el sustrato de ADN en forma de *burbuja*, se visualizan dos bandas: una al mismo nivel que la banda de retardo obtenida con el resto de sustrato y otra banda con un retardo mayor. Puede que este retardo superior se deba a la unión de dos moléculas de BcMCM, una por cada sección de ssADN de la sonda *burbuja*.



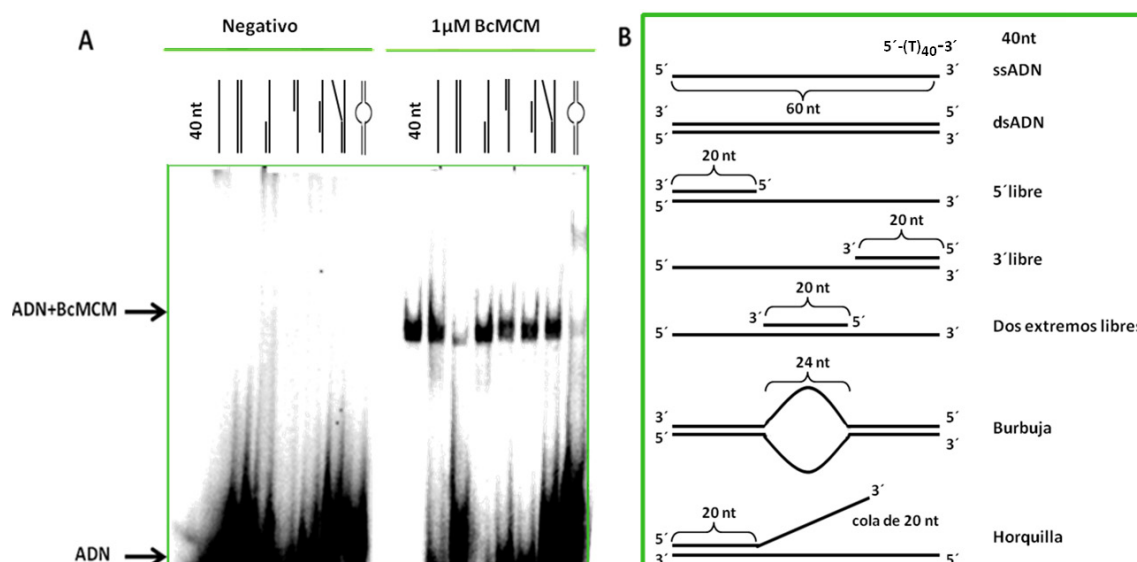


Figura 4.10. Interacción entre BcMCM y diferentes estructuras de ADN. **A.** Gel en condiciones no desnaturalizantes del 5 % poliacrilamida. Sobre cada una de las calles se indican las estructuras de ADN empleadas en la interacción. A la derecha del gel aparece señalado con flechas las bandas de retardo obtenidas tras la interacción de BcMCM (1 µM) con 1 nM de ADN. **B.** Esquema de las sondas de ADN empleadas en el ensayo de retardo.

4.5.1.2. BcMCM es capaz de unir ssADN de una longitud superior a 20 nucleótidos

Para analizar la mínima longitud de ADN necesaria, se usaron sondas de ADN poli (T) de distintas longitudes. Todas las sondas se marcaron radiactivamente con $[\gamma\text{P}^{32}]\text{ATP}$ y polinucleótido quinasa T4 en el extremo 5' de los oligonucleótidos (Materiales y Métodos 3.5.2.). Tal como se puede apreciar en el gel (Figura 4.11A), la longitud mínima de ADN que la proteína fue capaz de unir entre las sondas usadas fue de 25 nucleótidos. La longitud de ADN para interaccionar con BcMCM debe ser superior a 20 nucleótidos, ya que no hay retardo en la reacción realizada con la sonda de 20 nt.

Para estudiar la afinidad de la interacción, se empleó una concentración creciente de proteína desde 0,1 µM a 8 µM (Figura 4.11B). La intensidad de las bandas del gel no desnaturalizante fue cuantificada con el programa ImageQuantTMTL (GE Healthcare). Para calcular la constante de disociación (Kd), se representó el valor de la fracción unida frente a la concentración de BcMCM utilizada en cada caso (Figura 4.11C). De esta representación se dedujo la constante de disociación con el programa "GraphPad Prism 4". El valor de la Kd es de 2,2 µM.



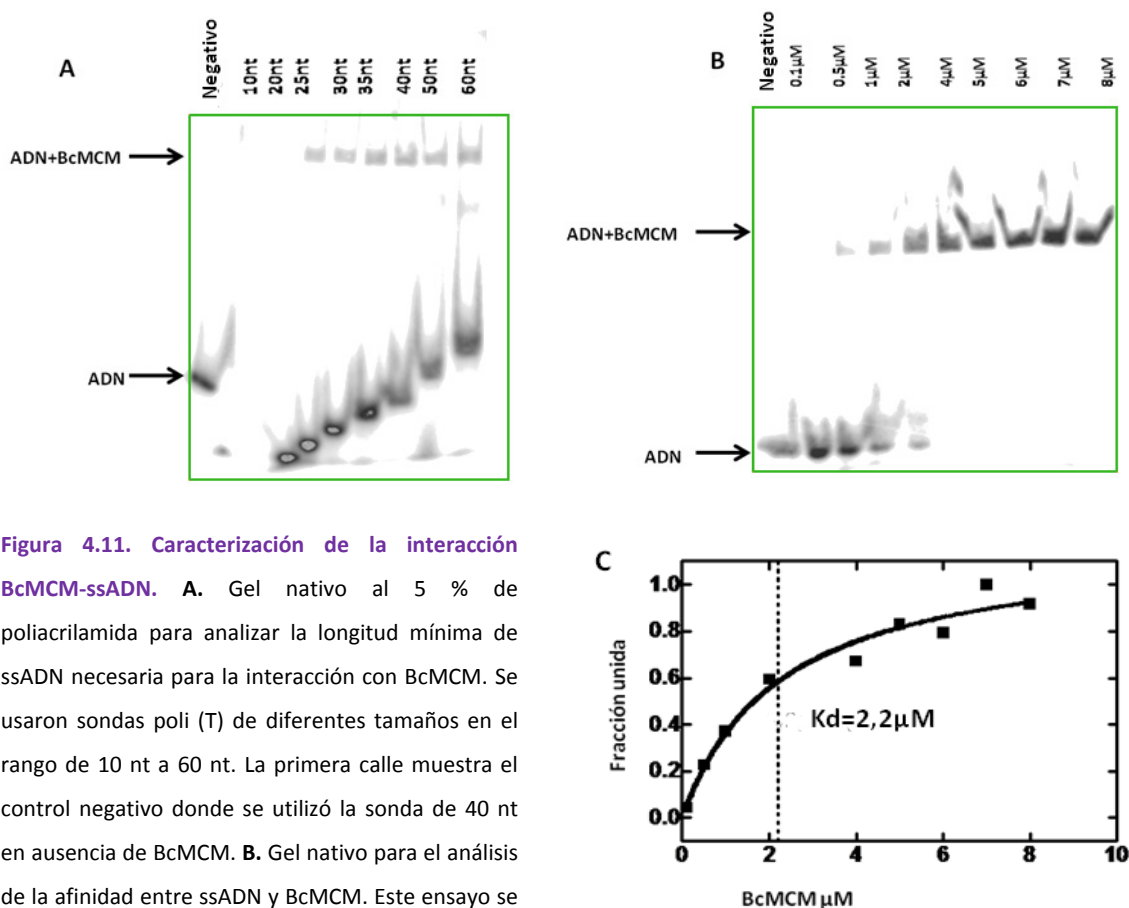


Figura 4.11. Caracterización de la interacción BcMCM-ssADN.

A. Gel nativo al 5 % de poliacrilamida para analizar la longitud mínima de ssADN necesaria para la interacción con BcMCM. Se usaron sondas poli (T) de diferentes tamaños en el rango de 10 nt a 60 nt. La primera calle muestra el control negativo donde se utilizó la sonda de 40 nt en ausencia de BcMCM. **B.** Gel nativo para el análisis de la afinidad entre ssADN y BcMCM. Este ensayo se realizó con la sonda de 40 nt. En la parte superior de cada calle, se indica la concentración de proteína (µM) usada en la reacción. **C.** Representación gráfica de los valores obtenidos en el ensayo de afinidad para el cálculo de la constante de disociación (K_d). Se representa el valor de la fracción unida frente a la concentración de BcMCM.

Todos estos ensayos de retardo en la movilidad electroforética para el análisis de la interacción BcMCM-ssADN, se realizaron en ausencia de ATP. Por tanto, al igual que las MCM de arquea, BcMCM une ADN en ausencia de ATP (Bochman & Schwacha, 2009). Por el contrario, el complejo Mcm2-7 eucariótico necesita ATP para unir ADN (Bochman & Schwacha, 2007).

4.5.1.3. Los mutantes del centro catalítico ATPasa no afectan la asociación con ssADN

Se estudió la capacidad de los distintos mutantes del centro catalítico de BcMCM de unir ADN. Dado que anteriormente ya se demostró que BcMCM es capaz de unir el ADN en ausencia de ATP, era de esperar que los tres mutantes fueran capaces de interaccionar con el ADN de cadena sencilla. Los ensayos se realizaron utilizando 1 nM de la sonda de 40 nt marcada radioactivamente y 1 µM de las distintas mutantes. El gel nativo (Figura 4.12) mostró

que los mutantes interaccionan con ssADN, confirmando la ausencia de efecto de estas mutaciones en el sitio ATPasa con respecto a la unión de ADN.

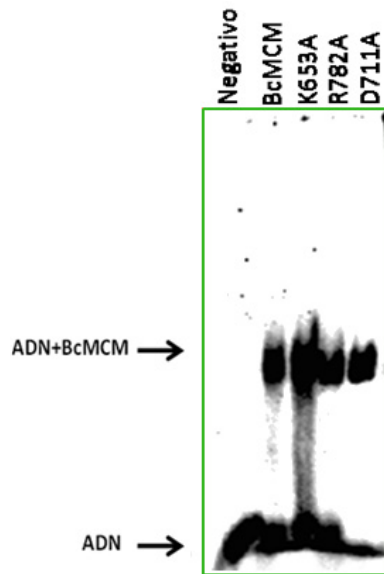


Figura 4.12. Estudio de la interacción de los mutantes del centro catalítico con ssADN. Gel de retardo en condiciones no desnaturalizantes del 5 % de poliacrilamida. Sobre las calles se indica la proteína utilizada en el ensayo. La primera calle muestra el control negativo que no contiene proteína. En la reacción se utilizó 1 μ M de proteína frente a 1 nM de ADN.

4.5.2. Actividad ATPasa

Debido a la presencia del dominio AAA+ en el C-terminal de la proteína, BcMCM pertenece a la familia de las helicasas replicativas MCM. Para poder separar la doble hebra de ADN, las helicasas utilizan la energía obtenida mediante la hidrólisis de ATP (Tuteja & Tuteja, 2004). Para analizar esta propiedad, se usó la técnica de acoplación de la hidrólisis de nucleótido a la reacción de transformación del piruvato en lactato en presencia de las enzimas piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Iost et al, 1999). La reacción comienza partiendo del fosfoenolpiruvato (PEP) y aprovechando la hidrólisis de ATP y la presencia de PK, se transforma en piruvato. El piruvato a su vez en presencia de la enzima LDH y el cofactor NADH, se transforma en lactato dando lugar así a la oxidación de NADH a NAD^+ (Figura 4.13).

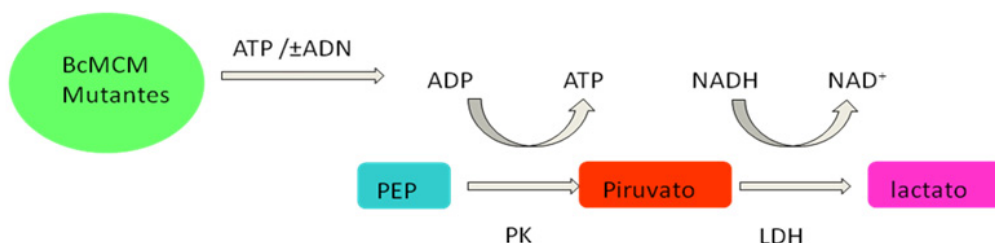
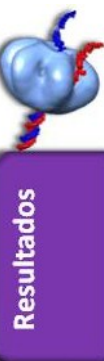


Figura 4.13. Representación esquemática de la reacción acoplada entre la formación de lactato a partir de PEP y la hidrólisis de ATP. El esquema muestra como la hidrólisis de ATP a ADP sirve como desencadenante de la reacción en la cual el NADH se oxida a NAD^+ . Se monitoriza la absorción de NADH a 340 nm en un espectrofotómetro para el análisis de la actividad ATPasa de las proteínas.



La cantidad de ATP hidrolizado se mide monitorizando la absorbancia de NADH a una longitud de onda de 340 nm mediante un espectrofotómetro. La absorbancia de NADH disminuye a medida que pasa a su forma oxidada NAD^+ . Por cada molécula de ATP hidrolizada, se oxida una molécula de NADH. Por tanto, la cantidad de NADH oxidado es equimolar a la cantidad de ATP hidrolizado.

4.5.2.1. La presencia de ssADN estimula la hidrólisis del ATP por BcMCM in vitro

Las helicasas son capaces de hidrolizar el enlace fosfodiéster del fosfato γ del ATP generando ADP. En muchas de ellas esta actividad se ve estimulada notablemente en presencia de ADN (Patel & Picha, 2000). La helicasa DnaB de *E. coli* (Shin & Kelman, 2006), al igual que las MCMs arqueas (Jenkinson & Chong, 2006; Sakakibara et al, 2009b), tiene actividad ATPasa dependiente de ADN, sin embargo, el complejo Mcm2-7 carece de esta dependencia o estimulación (Davey et al, 2003).

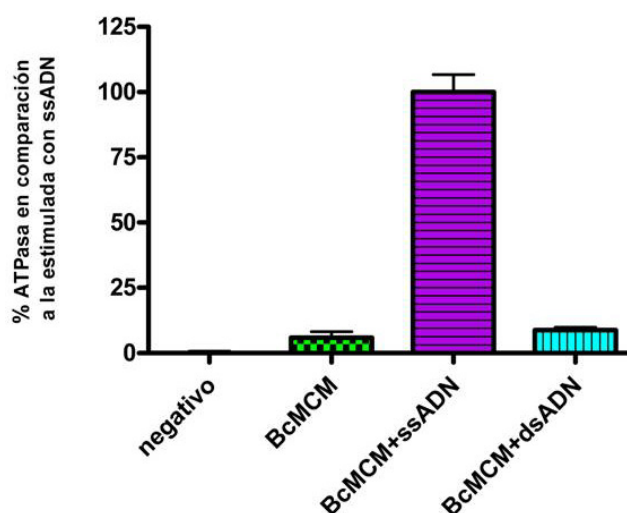


Figura 4.14. Estimulación de la hidrólisis de ATP de BcMCM en presencia de ssDNA. Los valores de hidrólisis aparecen cuantificados en porcentaje respecto a la estimulación de ssADN, donde este valor se tomó como el 100 %. El ensayo en presencia de dsADN no causa una estimulación en la hidrólisis de nucleótido. La hidrólisis de ATP en presencia de dsADN muestra un valor de $8,81 \pm 1$ % respecto al valor de $100 \pm 6,7$ % de actividad ATPasa en presencia de ssADN. Para cada reacción se utilizó $1 \mu\text{M}$ de BcMCM. El control negativo contiene los reactivos del ensayo sin BcMCM. Los sustratos de ADN empleados fueron ssM13 como ssADN y la sonda dsADN como ADN de doble cadena. Cada reacción se realizó tres veces. En la gráfica se muestra la media de los tres ensayos con su valor de s.e.m.

La actividad ATPasa de la BcMCM se analizó en ausencia y en presencia tanto de ssADN como de dsADN. Estudios anteriores han revelado que la hidrólisis de ATP de BcMCM es estimulada en presencia de ssADN (Samuels et al, 2009). Sin embargo, la actividad ATPasa en

presencia de dsADN no mostró ningún cambio respecto al valor de la actividad sin ADN. Este resultado indica que la hidrólisis de ATP solo se estimula específicamente con ssADN (Figura 4.14).

4.5.2.2. Contribución de diferentes motivos a la actividad ATPasa

En las proteínas de la familia AAA⁺, como las helicasas MCM, el sitio activo para la unión e hidrólisis del ATP se encuentra en la interfaz formada entre la intersección de dos subunidades vecinas del complejo. Una de las subunidades aporta los motivos conservados Walker A, Walker B y el sensor I que actúan en *cis*, mientras que la subunidad vecina participa en la catálisis con el motivo denominado “dedo de Arginina” y sensor II que actúan en *trans*. De esta manera, cada uno de estos motivos juega distintos papeles durante la hidrólisis. El motivo Walker A interviene en la unión directa al ATP, mientras que tanto el Walker B como el sensor I se encargan de orientar la molécula de agua para el ataque nucleofílico en la hidrólisis. Además, el “dedo de Arginina” y el sensor II participan durante la catálisis contactando al fosfato γ del ATP y señalizan el estado o la ocupancia en el que se encuentra el nucleótido unido al centro catalítico (Bochman & Schwacha, 2009; Erzberger & Berger, 2006).

Cada uno de los motivos juega un papel durante la reacción de hidrólisis del nucleótido. El diseño de las mutaciones intenta diseccionar la función de cada una de esas regiones. Cada mutación afecta en un grado diferente a la hidrólisis de ATP. A pesar de ello, en todos los mutantes se observó que la hidrólisis se encuentra estimulada por la presencia de ssADN (Figura 4.15). Al mutar el residuo Lisina del motivo Walker A (K653A) del centro catalítico, la actividad fue abolida, lo que indica su importancia en la catálisis. Al mutar la Arginina a Alanina en el “dedo de Arginina”, R782A, la cinética de la hidrólisis es un 40 % menor respecto al de la proteína salvaje. Al realizar la mutación D711A en el motivo Walker B, la actividad ATPasa disminuye en un 65 % (Figura 4.15), indicando que los diferentes motivos realizan distintas funciones en la hidrólisis del nucleótido. En arqueas, la mutación en cualquiera de los tres motivos elimina por completo la hidrólisis de ATP (Moreau et al, 2007). En el complejo Mcm2-7 eucariótico, una mutación en un motivo Walker A de cualquier subunidad, elimina la capacidad de hidrólisis de ATP de todo el complejo (Schwacha & Bell, 2001). Sin embargo, las mutaciones realizadas en los motivos Walker B y “dedo de Arginina”, sugieren que solo las subunidades 4, 6 y 7 son las implicadas en la actividad ATPasa del complejo, mientras que 2, 3 y 5 actuarían como cofactores (Bochman et al, 2008).



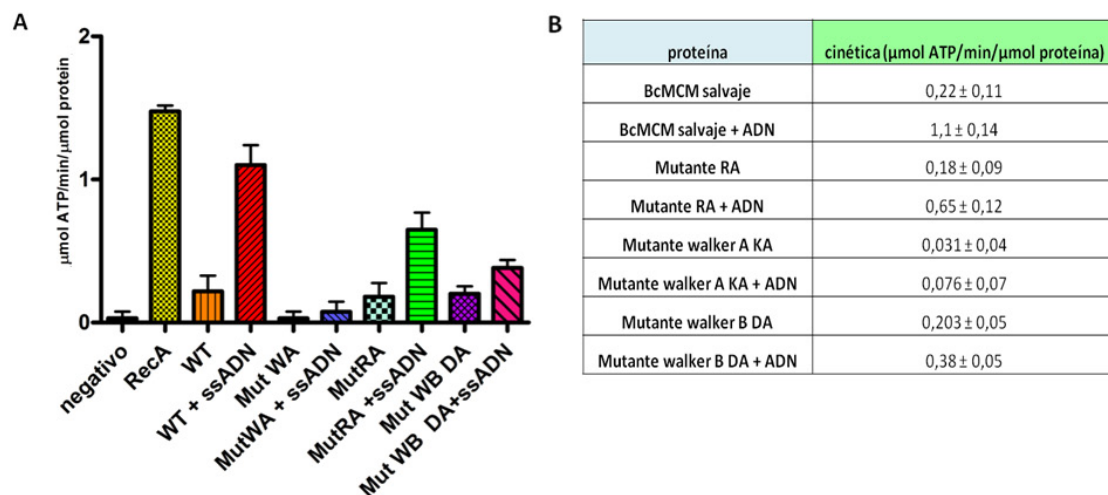


Figura 4.15. Efecto de las mutaciones en los motivos ATPasa en la hidrólisis de ATP de BcMCM. **A.** Cinética de hidrólisis de BcMCM y los distintos mutantes del centro catalítico. La gráfica muestra la capacidad ATPasa de cada especimen en presencia y ausencia de ssADN. La actividad ATPasa de la proteína RecA con ssADN se usó como control positivo del ensayo. El control negativo fue el mismo que en la Figura 4.14. Se muestra el resultado del ensayo realizado por triplicado para cada muestra incluyendo el valor de s.e.m. **B.** Valores cinéticos de la actividad ATPasa de cada proteína tras tres medidas con el valor de s.e.m. La cinética se midió en unidades de μmol ATP hidrolizado/min/μmol de proteína ATPasa.

4.5.3. BcMCM es capaz de desenrollar el dsDNA

Las MCM son helicasas replicativas que aprovechan la energía libre obtenida de la hidrólisis del ATP para separar las hebras de ADN de doble cadena. Se consideran también translocasas porque se mueven unidireccionalmente sobre la hebra de ADN a la que están unidas, desplazando la complementaria (Tuteja & Tuteja, 2004). La actividad helicasa de BcMCM se analizó mediante métodos electroforéticos en geles no desnaturizantes, valorando la cantidad de ssADN desplazada respecto al sustrato dsADN inicial. La presencia de glutamato estimula la actividad helicasa de la proteína BcMCM *in vitro*. Este comportamiento de BcMCM es similar a la dependencia por los aniones específicos demostrada para el complejo Mcm2-7 (Bochman & Schwacha, 2008).

4.5.3.1. BcMCM separa la doble hélice de ADN con polaridad 3'-5'

El término polaridad hace referencia a la dirección del movimiento de la helicasa sobre el ADN de cadena sencilla. La polaridad puede ser de 3' a 5', como el de las MCM arqueas y eucariotas, o de 5' a 3', como en las helicasas bacterianas (Tuteja & Tuteja, 2004). BcMCM al igual que las MCMs, separa la doble hélice en dirección 3'-5' (Figura 4.16A) (Samuels et al,

2009). Esta helicasa no es capaz de separar las hebras de ADN con extremos romos o con el extremo 5' libre. Sin embargo, muestra una clara actividad con sustratos con estructura de horquilla o que contengan un extremo 3' libre.

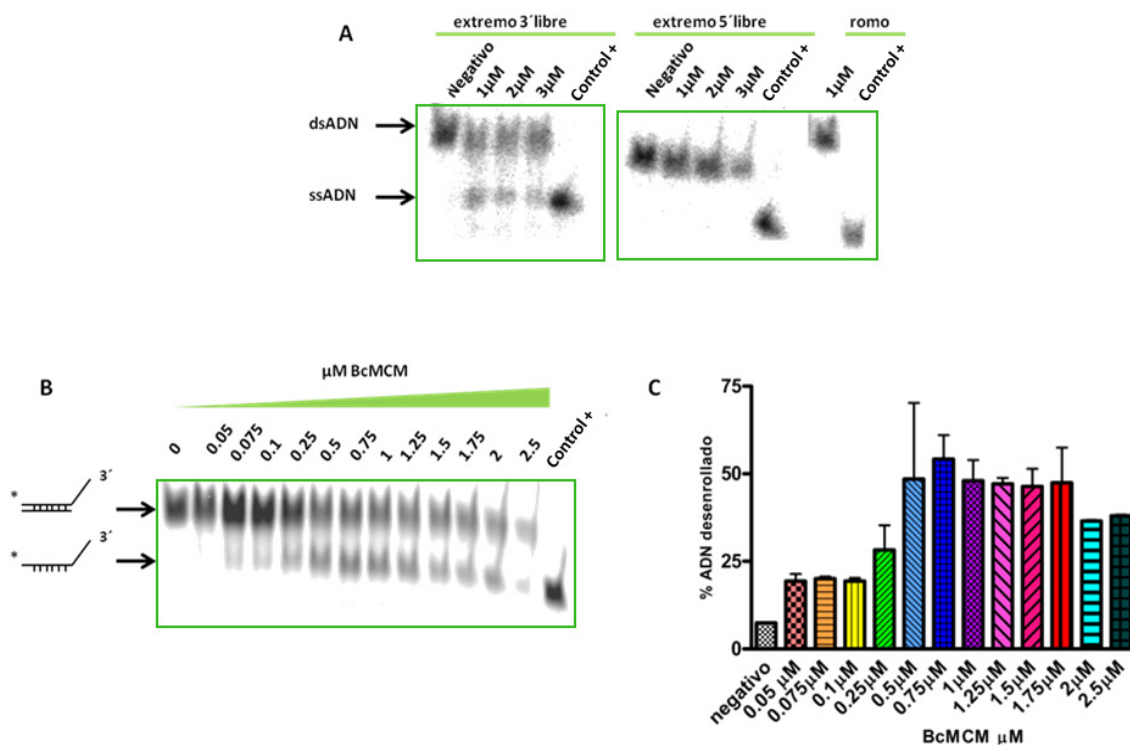


Figura 4.16. Polaridad y máxima actividad helicasa. **A.** Análisis electroforético del desplazamiento de ssADN con distintos sustratos. Se utilizaron tres sustratos de ADN diferentes: con el extremo 3' libre (*Helicasa1-3' libre*), con el extremo 5' libre (*Helicasa1-5' libre*) y con los extremos romos (*Helicasa1-Helicasa2*). BcMCM solo muestra actividad helicasa en presencia de un ADN con el extremo 3' libre. **B.** Gel nativo que muestra la máxima cantidad de ssADN que BcMCM es capaz de desplazar. Se aplicó un gradiente de concentración (0-2,5 μM) de proteína frente a una concentración constante de ADN de 0,5 nM. Las concentraciones de BcMCM se señalan sobre las calles del gel. El control + es la muestra hervida, que representa la totalidad de ssADN desplazada. El control negativo consiste en un ensayo similar sin proteína. **C.** Representación de la actividad helicasa saturada. Los valores son representados como el porcentaje de ADN desplazado frente al total (Control +). El ensayo se realizó por triplicado con el valor de error estándar mostrado sobre cada reacción.

Mediante un gradiente de concentración de BcMCM se analizó la relación ADN: proteína necesaria para desplazar la mayor cantidad de ssADN posible. Una vez alcanzada la relación 1:1000, la cantidad de ssADN desplazada se mantiene estable (Figura 4.16B y 4.16C), independientemente del incremento de la concentración de BcMCM. La proteína BcMCM solo es capaz de desenrollar el 50 % del dsADN total *in vitro*. Puede que para desplazar el 100 % de dsADN, la proteína necesite un cofactor u otras condiciones de reacción diferentes a las empleadas.

4.5.3.2. Los mutantes de los motivos implicados en la actividad ATPasa afectan a la actividad helicasa de BcMCM desigualmente

La actividad helicasa es dependiente de la energía libre obtenida tras la hidrólisis de ATP. Por tanto, cualquier variación en la hidrólisis puede afectar la capacidad de la proteína para desenrollar el ADN. En la sección 4.5.2.2. se ha mostrado que las mutaciones de los motivos catalíticos afectan de manera diferente a la actividad ATPasa de BcMCM. El deterioro de la capacidad de unir ATP al mutar el motivo Walker A, anula la actividad helicasa de BcMCM. Sin embargo, tanto con el sustrato en forma de horquilla (*Helicasa1-Helicasa2*) como con el que contiene el extremo 3' libre (*Helicasa1-3' libre*), los mutantes D711A y R782A desplazan el ADN de cadena sencilla. Este resultado está en concordancia con la actividad ATPasa observada, dado que el mutante del motivo Walker B muestra menos actividad helicasa que el mutante en el “dedo de Arginina” (Figura 4.17).

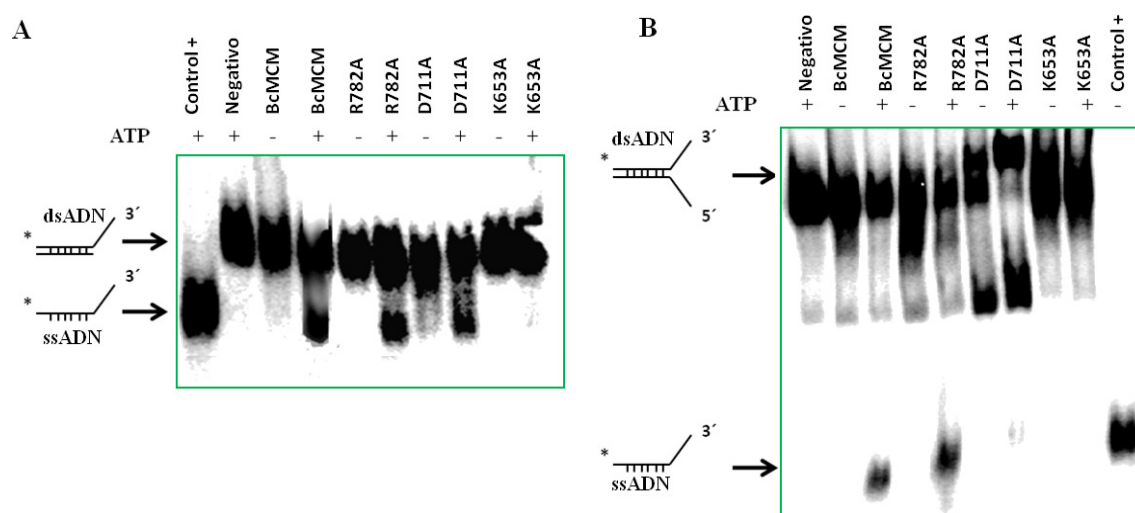


Figura 4.17. Análisis de la actividad helicasa de los mutantes BcMCM en geles nativos. Se utilizó un sustrato con un fragmento de ssADN en el extremo 3' (la sonda hibridada *Helicasa1-3' libre*) (A) y otro en forma de horquilla (la sonda hibridada *Helicasa1-Helicasa2*) (B). En cada calle aparece señalizada el tipo de muestra. Se indica cuando el ensayo contiene 5 mM de ATP. En ausencia de ATP BcMCM no tiene actividad helicasa. En la parte izquierda de los geles se señala con una flecha la banda de dsADN inicial y el del ssADN desplazado.

El comportamiento de los mutantes de BcMCM difieren de los resultados de este ensayo para las MCM de arqueas en la literatura. En este caso, las mutaciones en los tres motivos abolen por completo la actividad helicasa de la proteína (Moreau et al, 2007). El comportamiento para el complejo Mcm2-7 eucariótico no es comparable, ya que los seis centros catalíticos parecen ser diferentes (Schwacha & Bell, 2001). Las mutaciones en los motivos catalíticos de Mcm2-7 demostraron que solo los centros activos formados entre

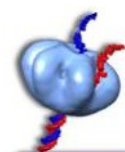
Mcm3/7, Mcm7/4 y Mcm4/6 son los que actúan en el desenrollamiento de dsADN (Schwacha & Bell, 2001).

4.5.4. Oligomerización de BcMCM

Una de las características de las proteínas de la familia AAA+ ATPasa es su capacidad de formar complejos hexaméricos. Tanto BcMCM como sus mutantes K653A, D711A y R782A, se purificaron en su estado monomérico, aunque se observó en el cromatograma de la columna de gel filtración de BcMCM y de las mutantes D711A y R782A un pequeño pico en forma de hombro perteneciente al complejo hexamérico. Se ha comprobado que en presencia de ATP, con o sin ADN, BcMCM oligomeriza formando complejos homohexaméricos. Este mismo efecto del nucleótido sobre la oligomerización ha sido observado previamente en otras helicasas como en el bacteriófago T7 (Hingorani & Patel, 1996), en SV40 LTag (Mastrangelo et al, 1989) y en DnaB de *E. coli* (Jezewska & Bujalowski, 1996). Estudios recientes en la oligomerización del subcomplejo Mcm4/6/7 sugieren un efecto estabilizador del nucleótido en la formación del hexámero (Ma et al, 2010). La unión de ATP ó ATPγS tiene un efecto estabilizador en la oligomerización del subcomplejo Mcm4/6/7 superior al del ADP (Ma et al, 2010). El análisis de la formación de oligómeros de BcMCM empleando microscopía electrónica ha mostrado hexámeros de BcMCM también en presencia del nucleótido ADP.

4.5.4.1. BcMCM forma complejos hexaméricos al asociarse a nucleótido en presencia de ciertos aniones

BcMCM forma complejos hexaméricos con ATP, en presencia y ausencia de ADN. Para la oligomerización es esencial la unión de nucleótido, pero no su hidrólisis, ya que en presencia del análogo no hidrolizables de ATP (ATPγS) o ADP también hexameriza. La helicasa LTag de SV40 también necesita la unión, pero no la hidrólisis de ATP, para la formación de complejos hexaméricos en ausencia de ADN (Mastrangelo et al, 1989). La mutación en el motivo Walker A, K653A, anula la capacidad de asociación con el ATP de BcMCM, y con ello su oligomerización. El mutante K653A es monomérico e inactivo (revisar los resultados de la actividad ATPasa y helicasa de la sección 4.5.2.2. y 4.5.3.2.). Sin embargo, los mutantes D711A y R782A hexamerizan y conservan parte de la actividad. Por tanto, el complejo homohexamérico es la forma activa de BcMCM. Esta oligomerización de BcMCM es favorecida por la presencia de aniones específicos (Bochman & Schwacha, 2008). La presencia de



glutamato amónico estabiliza la oligomerización, favoreciendo la forma hexamérica en el equilibrio monómero-hexámero de BcMCM.

4.5.4.2. BcMCM es capaz de formar complejos hexaméricos en presencia de ADN in vitro

BcMCM interacciona con ssADN en ausencia de ATP. Sin embargo, la unión a ATP ó ATP γ S estimula la formación de complejos hexaméricos de BcMCM. Los complejos unen ADN y esa unión parece dar lugar a un cambio conformacional que estabiliza al complejo. Mediante el ensayo de retardo de la movilidad electroforética del ADN utilizando BcMCM en presencia de nucleótido, se observó un cambio en la movilidad de la banda retardada respecto al causado en ausencia de ATP γ S. Este ensayo EMSA en presencia del nucleótido no hidrolizable, ATP γ S, se realizó utilizando distintos tiempos de incubación. En un principio se aplicaron las mismas condiciones electroforéticas utilizadas para detectar la interacción del monómero BcMCM-ssADN. Sin embargo, se observó que la forma hexamérica no penetraba en el gel del 5 % de poliacrilamida, quedando retenida en el pocillo. Por lo tanto, se emplearon geles del 4 % de poliacrilamida suplementados con 5 % de glicerol (ver Materiales y Métodos sección 3.5.2.), tal y como se hizo en el estudio del complejo CMG (Ilves et al, 2010). Como sustrato de ADN para la interacción se escogió el oligonucleótido poli (T) de 40 nt marcado previamente con [γ 32P]ATP radioactivo. Inicialmente se apreció una única banda perteneciente al retardo ocasionado por la interacción del monómero con el oligonucleótido. Pero tras el transcurso de doce minutos de incubación con el nucleótido, en el gel se distinguían dos bandas de retardo. Una primera interpretada como el monómero unido al ADN, y una segunda, de una movilidad menor, interpretada como la interacción del complejo hexamérico y el ADN (Figura 4.18). Por lo tanto, la proteína BcMCM incubada unos minutos a 30° C forma hexámeros unidos al ADN. A partir de este resultado surge la duda de si primero se forma el hexámero y luego se une el ADN, o por el contrario, los monómeros de BcMCM se ensamblan alrededor de la molécula de ADN formando el complejo. El experimento de retardo sugiere la segunda opción como la más probable, dado que la banda formada por el monómero disminuye al aparecer con menor movilidad la banda del hexámero. Sin embargo, puede ser que exista un equilibrio entre la forma monomérica y la hexamérica de BcMCM en presencia de nucleótido, y que la unión a ADN favorezca la formación del complejo hexamérico desplazando el equilibrio.



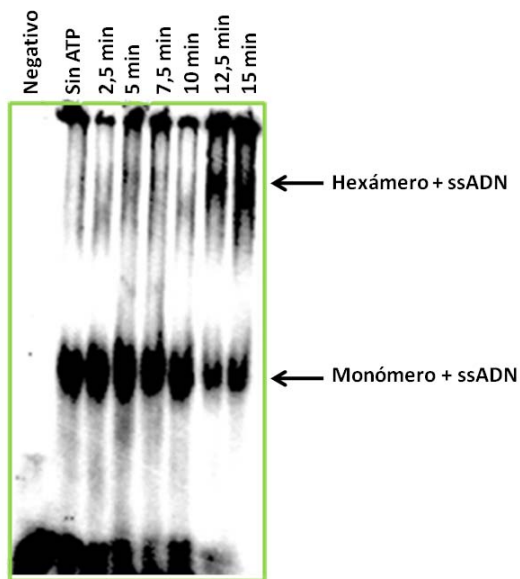


Figura 4.18. Interacción del complejo hexamérico BcMCM con ssADN. Gel en condiciones no desnaturalizantes del 4 % poliacrilamida y 5 % de glicerol. Sobre las calles se indica el tiempo de incubación a 30° C de la muestra con el ADN. En el lateral derecho se señala las bandas que corresponden al retardo producido por el monómero y el hexámero. El tampón de electroforesis fue compuesto de TBE y 6 mM de $Mg(OAc)_2$.

4.5.4.3. El ADN estabiliza el complejo homohexamérico de BcMCM

Se evaluó la estabilidad del complejo BcMCM-ADN empleando electroforesis en condiciones nativas, cromatografía de filtración en gel y la microscopía electrónica de transmisión y reconstrucción tridimensional (3D). Los geles nativos mostraron principalmente dos bandas intensas para la muestra BcMCM hexamerizada en presencia de ATPγS y ADN. La banda de menor peso molecular correspondía a la forma monomérica de BcMCM, y la otra de aparentemente 700 kDa, al complejo homohexamérico. Se observó una única banda de 100 kDa para la muestra de hexamerización sin ADN (Figura 4.19). Este resultado indica la inestabilidad de aquellos oligómeros formados únicamente por la asociación a ATPγS.

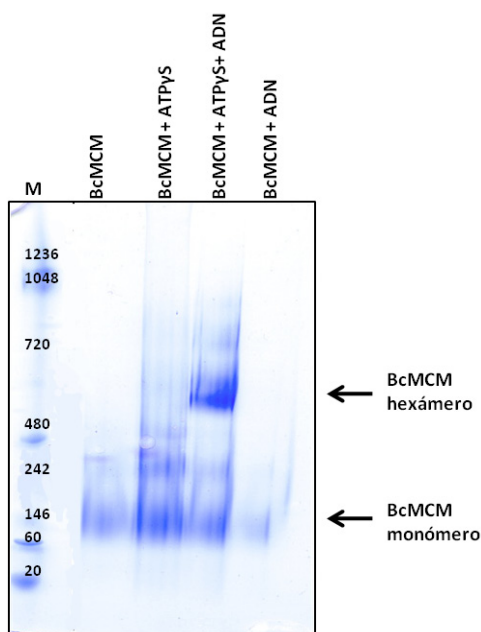


Figura 4.19. Formas oligoméricas de BcMCM en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas. Geles nativos comerciales "Novex®Native NuPAGE 3-12 % Bis Tris Gel" (Invitrogén). La calle M hace referencia al marcador de peso molecular de proteínas. Como control negativo se cargo la proteína BcMCM sin nucleótido ni ADN en las condiciones de oligomerización. Para las reacciones se empleó 1,5 μM de proteína BcMCM y 4 μM del oligonucleótido 50 nt. En la parte lateral del gel se señala la banda perteneciente al monómero BcMCM y al complejo hexamérico BcMCM.



La cromatografía en gel filtración mostró un claro desplazamiento del pico de elución desde la forma monomérica a la hexamérica del complejo BcMCM-ssADN (Figura 4.20). No se apreció ningún cambio en el perfil cromatográfico del homohexamero BcMCM en ausencia de ADN, que solo mostraba un único pico de peso molecular aparente de 100 kDa. Puede que las interacciones intermoleculares del homohexamero formado con el nucleótido pero en ausencia de ADN, no estabilicen suficientemente el oligómero en un tampón carente de nucleótido. Probablemente se requeriría la presencia permanente del nucleótido para que el complejo no se disociase. Sin la presencia del nucleótido en el tampón, el equilibrio monómero-hexamero se desplaza hacia la forma monomérica.

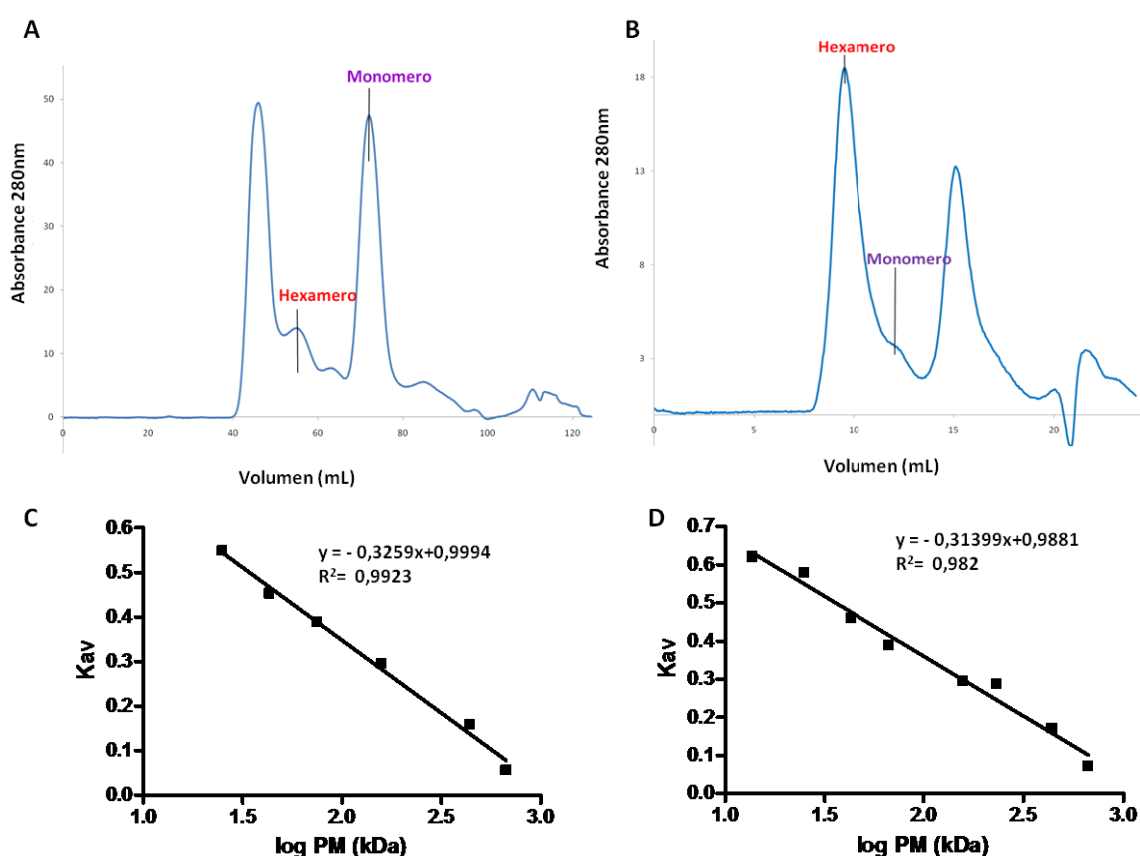


Figura 4.20. Análisis de la hexamerización de BcMCM en presencia de ADN y ATPγS mediante cromatografía de gel filtración. **A.** Perfil de elución de la columna *Superdex 200 16/60 PG* (GE Healthcare) de BcMCM durante su purificación en ausencia de ATPγS y ADN. El cromatograma muestra un claro pico de elución para el monómero, frente a un pequeño pico en forma de hombro que correspondería al complejo hexamérico. La banda anterior al hexámero pertenece al volumen de exclusión y corresponde a muestra agregada. **B.** Perfil cromatográfico de la hexamerización de BcMCM tras incubarla con ATPγS y ADN, y cargar la muestra en una columna *Superdex 200 10/300 analítica* (GE Healthcare). La banda mayoritaria corresponde al peso molecular del complejo hexamérico. El monómero eluye formando un pequeño hombro posterior al pico del complejo. **C y D.** Curvas de calibración de las columnas *Superdex 200 16/60* y *Superdex 200 10/300 analítica* obtenidas utilizando seis y ocho marcadores de peso molecular. Se muestra la ecuación de la calibración con el correspondiente coeficiente de correlación (R^2).

En el microscopio electrónico, se observaron complejos hexaméricos de BcMCM con ADN y sin ADN. Se recogieron sendos conjuntos de datos y se generaron modelos 3D de ambas estructuras. Las estructuras tridimensionales de BcMCM con y sin ADN mostraron diferencias conformacionales entre los dos complejos. La unión a ADN parece estabilizar la interacción entre las subunidades mediante un cambio conformacional dentro del complejo (sección 4.6.2.2.).

4.5.4.4. Oligomerización de los dominios aislados

El dominio N-terminal de las MCMs es el responsable de la oligomerización, no contiene ningún dominio catalítico pero posee motivos de unión a zinc. El análisis estructural y bioquímico de la parte N-terminal de las MCMs de arqueas, muestran un complejo homohexamérico en forma de anillo capaz de unir ADN (Fletcher et al, 2003; Forsburg, 2004; Liu et al, 2008; Sakakibara et al, 2009b). En BcMCM, el fragmento N-terminal es sustituido por un dominio que guarda una baja homología con las primasas (McGeoch & Bell, 2005).

El dominio helicasa, BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹, forma complejos hexaméricos en las mismas condiciones que la proteína BcMCM completa. En cambio, el dominio primasa BcMCM¹⁻³⁶¹ de 40 kDa, no parece ser capaz de oligomerizar y se mantiene aparentemente en su estado monomérico, propio de la mayoría de la primasas. Ambos dominios están conectados por una secuencia peptídica de 140 aminoácidos. La organización estructural de los dominios recuerda a la primasa-helicasa del bacteriófago T7 (Toth et al, 2003). En esta primasa-helicasa T7 es la oligomerización del dominio helicasa, el que promueve la presencia de múltiples primasas dentro de un mismo complejo. Esta misma situación se da en otras proteínas que combinan ambas actividades (Corn & Berger, 2006). En el complejo BcMCM cada subunidad aporta un dominio primasa, formando un complejo que contiene seis primasas. Por tanto, al igual que en el complejo T7, la hexamerización del dominio BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ favorece la presencia de múltiples primasas.

4.5.5. BcMCM sintetiza cebadores independientemente de la oligomerización

Las primasas sintetizan pequeños fragmentos de ARN denominados cebadores, que sirven de molde para la ADN polimerasa. La síntesis de cebadores se inicia con la unión de dos ribonucleótidos formando un dinucleótido y liberando una molécula inorgánica de pirofosfato. A partir de ahí, se añaden ribonucleótidos hasta la formación del cebador.



Para la síntesis de un cebador, la primasa necesita un ADN molde que marque la especificidad del cebador y ribonucleótidos para su síntesis. La progresión de los fragmentos de ARN sintetizados se analizó por electroforesis en geles desnaturizantes de urea. Para ello, se utilizó $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{UTP}$ como ribonucleótido marcado para el seguimiento de la actividad primasa. BcMCM es capaz de sintetizar fragmentos de ARN en presencia de ssM13 y ribonucleótidos (Figura 4.21A). La capacidad de BcMCM de sintetizar cebadores es independiente de su estado de oligomerización. El dominio primasa es activo tanto en la forma hexamérica y monomérica de BcMCM, así como cuando BcMCM contiene la mutación K653A (Figura 4.21B).

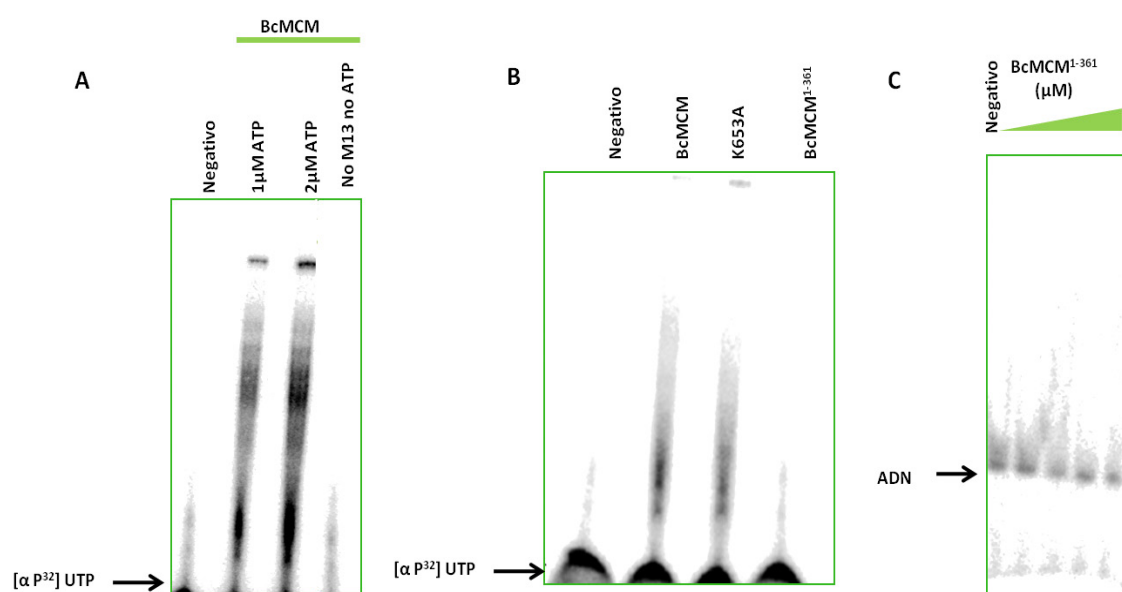


Figura 4.21. Caracterización de la actividad primasa de BcMCM. **A.** Análisis electroforético en condiciones desnaturizantes de la síntesis de cebadores de BcMCM utilizando distintas concentraciones de ATP. Como control negativo, además de la reacción sin proteína, se analizó la actividad primasa en ausencia del molde de ADN ssM13. **B.** Estudio de la síntesis de cebadores de BcMCM, K653A y el dominio primasa aislado, BcMCM¹⁻³⁶¹. El exceso del nucleótido marcado aparece en la parte inferior del gel. El análisis de la actividad primasa de la mutante K653A sirve para analizar la influencia del estado de oligomerización en la actividad. **C.** Ensayo EMSA de la interacción entre BcMCM¹⁻³⁶¹ y ssADN. Se realizó un gradiente de concentración del dominio primasa desde 1-8 μM frente a una concentración constante de ssADN de 1 nM. No se observó ningún retardo de la banda del ADN.

Sin embargo, el dominio primasa BcMCM¹⁻³⁶¹ en ausencia del helicasa no es capaz de sintetizar fragmentos de ARN. Además, los ensayos de EMSA realizados con BcMCM¹⁻³⁶¹ no detectaron ninguna interacción entre el dominio primasa y el ssADN (Figura 4.21C). Sin unión al ADN de molde la primasa es incapaz de sintetizar cebadores. Estudios previos realizados en otros laboratorios demostraron la capacidad de unión a ADN de la construcción primasa BcMCM¹⁻³⁹⁹ (Samuels et al, 2009). Puede que el sitio de unión a ADN se encuentre entre los 30

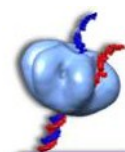
aminoácidos adicionales de esta construcción o que sean necesarios para adoptar una conformación adecuada para la unión al ácido nucleico. Otra posibilidad a considerar es que el dominio primasa necesite del helicasa para su función. La helicasa de muchas especies facilita la unión de la primasa al ADN molde y estimula la actividad primasa como se ha descrito para *E. coli* (Bhattacharyya & Griep, 2000; Johnson et al, 2000; Tougu et al, 1994). De la misma manera que la helicasa favorece y facilita la acción de la primasa, ésta a su vez estimula la actividad ATPasa de la helicasa (Bird et al, 2000; Corn & Berger, 2006).

4.5.6. Caracterización bioquímica del dominio helicasa BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹

La parte C-terminal de la proteína contiene el dominio AAA+ ATPasa. Por lo tanto, es la responsable de la función de BcMCM como helicasa replicativa. Se desconoce hasta el momento la influencia del dominio primasa en la actividad helicasa de BcMCM. En otras especies es clara la cooperatividad existente entre primasas y helicasas, favoreciéndose recíprocamente. No solo la helicasa estimula y colabora con la actividad de la primasa, sino que la propia primasa ha demostrado estimular la actividad helicasa a varios niveles (Corn & Berger, 2006).

4.5.6.1. El dominio BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ interacciona con ssADN

En ausencia del dominio primasa, la proteína mantiene su capacidad de interaccionar con el ADN de cadena sencilla (Figura 4.22). Por lo tanto, BcMCM¹⁻³⁶¹ no influye en la capacidad de unir ssADN del BcMCM *in vitro*. En los resultados demostrados al caracterizar el dominio BcMCM¹⁻³⁶¹, se observó la ausencia de interacción de este dominio con ssADN. Previamente quedó demostrada la capacidad de unión del dominio BcMCM¹⁻³⁹⁹, sugiriendo la contribución de ambos dominios (primasa y helicasa) en la capacidad total de unión de BcMCM (Samuels et al, 2009). Con los resultados obtenidos en este trabajo, no se puede concluir si la unión a ADN de BcMCM depende únicamente del dominio helicasa, o si también depende de otro motivo independiente que se encuentra entre los residuos 361 y 501.



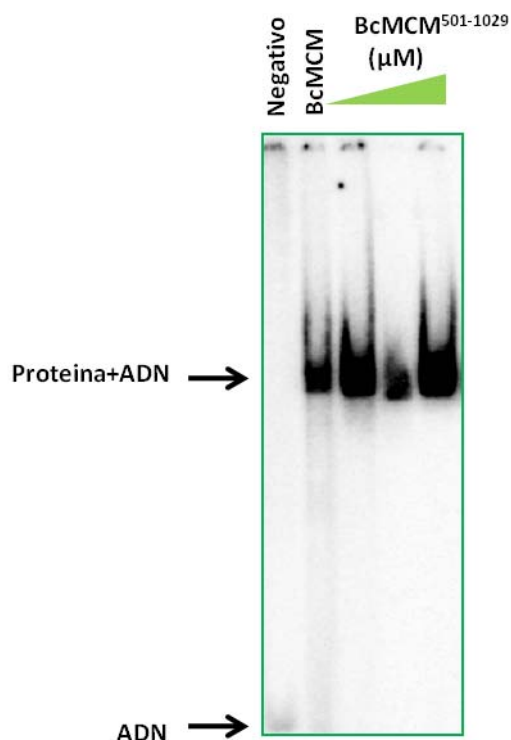


Figura 4.22. Interacción de BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ con ssADN. Gel de electroforesis en condiciones nativas utilizado para analizar el retardo causado por la unión de ssADN al dominio helicasa. El ADN empleado como sustrato fue el oligonucleótido poli (T) de 40 nt a una concentración de 1 nM. Como control positivo se utilizó 1 μM de BcMCM. Se realizó un gradiente de concentración de BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ desde 1 a 3 μM. En el lateral se señala con una flecha la banda de retardo de ADN tras la unión de las proteínas.

4.5.6.2. El dominio helicasa sin la presencia del dominio primasa posee actividad ATPasa

La capacidad de hidrólisis de ATP de la BcMCM proviene del dominio AAA+ ATPasa localizado en su parte C-terminal. BcMCM es una proteína excepcional, siendo la primera MCM que en su N-terminal posee un dominio primasa. Por ello, es preciso ver si este dominio N-terminal influye en la actividad ATPasa de la proteína como ocurre en la helicasa DnaB de *E. coli* (Bird et al, 2000; Corn & Berger, 2006). El análisis de la capacidad de hidrólisis de BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹, en ausencia y presencia de ssADN, mostró que el dominio solo sin la primasa hidroliza el ATP. En comparación con BcMCM, la capacidad de hidrólisis de ATP del dominio helicasa BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ aislado disminuye, llegando a poseer solo el 60 % de la capacidad de la proteína completa. Pero el resultado más sorprendente fue que al eliminar el fragmento N-terminal de BcMCM, la hidrólisis de ATP se volvía independiente de la presencia de ssADN (Figura 4.23).

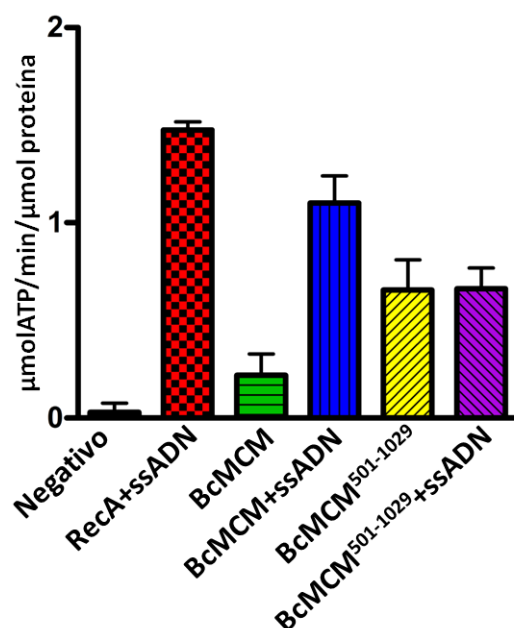


Figura 4.23. Análisis de la hidrólisis de ATP del dominio helicasa BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹. Se analizó la hidrólisis en presencia y ausencia de ssADN. En las reacciones se utilizó 1 μM de la proteína BcMCM y el dominio helicasa BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹. El control negativo es en ausencia de proteínas y como control positivo se empleó la proteína RecA en presencia de ssADN. Cada ensayo se realizó por triplicado con los valores de error estándar mostrados mediante las barras de error en la gráfica. Se muestra la actividad para BcMCM con y sin ssADN para su comparación con el dominio helicasa solo.

4.5.6.3. El dominio helicasa es capaz de separar la doble hélice de ADN

En ausencia del dominio primasa, la proteína posee actividad helicasa dependiente de glutamato. BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ es capaz de desplazar el ssADN del sustrato en forma de horquilla (*Helicasa1-Helicasa2*) o con un extremo 3' libre (*Helicasa1-3'libre*), aparentemente con una menor capacidad que la proteína BcMCM completa (Figura 4.24). Esto sugiere, que tal y como ocurre en otras especies, la primasa estimularía la capacidad de separar dsADN del dominio helicasa, cuando ambas se encuentran formando el BcMCM (Bird et al, 2000; Corn & Berger, 2006).

El dominio helicasa aislado mantiene las funciones propias de las helicasa replicativas. Sin embargo, la actividad ATPasa y la capacidad de separación de la doble hélice sufre una leve disminución respecto a BcMCM. Por tanto, la presencia del dominio primasa causa cierto efecto estimulante en las actividades del dominio helicasa, tal y como ocurre en la mayoría de la especies (Kuchta & Stengel, 2010).



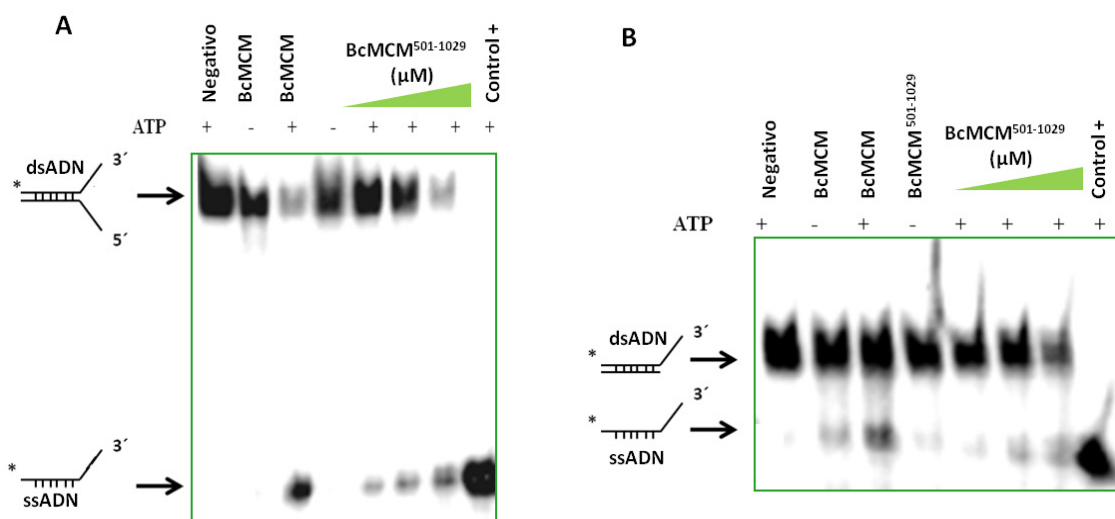


Figura 4.24. Estudio de la actividad helicasa del dominio BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹. Análisis electroforético del ADN de cadena sencilla desplazada por la acción del dominio helicasa. Se utilizaron dos sustratos diferentes, el primero en forma de horquilla replicativa (*Helicasa1-helicasa2*) (A) y el otro con el extremo 3' libre (*Helicasa1-3' libre*) (B). En el lateral se muestra la altura de las bandas de dsADN inicial y de la ssADN desplazada. El control negativo es la reacción en ausencia de proteína. BcMCM se utilizó como control positivo a una concentración de 0,5 μM. Se empleó un gradiente de concentración de BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ desde 0,5 hasta 2 μM. Los sustratos de ADN se utilizaron a una concentración de 0,5 nM. El control + representa la muestra hervida que equivale al 100 % del ADN desplazado.

4.5.7. Caracterización bioquímica de GST-BcMCM

El análisis estructural de la BcMCM con la etiqueta formada por seis histidinas y GST en la parte N-terminal, se utilizó para la localización de los dominios primasa y helicasa en el volumen 3D de BcMCM por microscopía electrónica. La masa añadida a la parte N-terminal podría cambiar la conformación y la actividad de la proteína. La proteína GST es un polipéptido de 27 kDa que tiende a interactuar entre sí formando dímeros. Por tanto, se caracterizó la proteína GST-BcMCM para comprobar que la etiqueta no afectase a la actividad enzimática de la proteína BcMCM.

4.5.7.1. GST-BcMCM interacciona con ssADN

La etiqueta histidina-GST no parece afectar a la interacción BcMCM-ssADN (Figura 4.25). Las interacciones internas entre los péptidos de GST de las subunidades permiten unir ADN de cadena sencilla generando un retardo visualizado en electroforesis de geles en condiciones no desnaturalizantes.

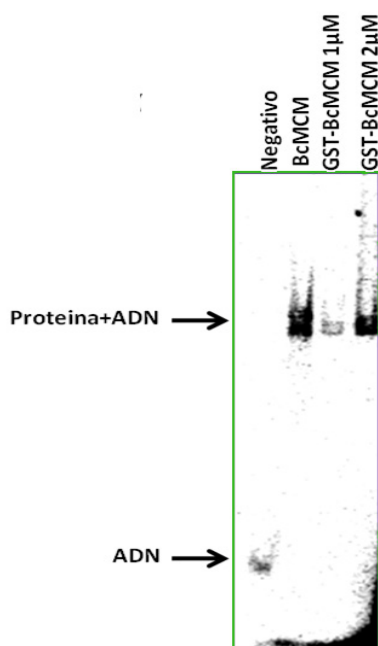


Figura 4.25. Interacción de GST-BcMCM con ssADN. Geles de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes para analizar el retardo causado en el ssADN por la unión al GST-BcMCM. El ADN utilizado como sustrato fue el oligonucleótido poli (T) de 40 nt a una concentración de 1 nM. Como control positivo se utilizó 1 μ M de BcMCM. En la reacción se utilizó 1 μ M y 2 μ M GST-BcMCM. En el lateral se muestra la banda de ssADN y el retardo sufrido tras la unión de la proteína de fusión.

4.5.7.2. La adición de la etiqueta seis histidinas-GST afecta levemente a la hidrólisis

Como era de esperar, el análisis indicó que el fragmento añadido en la parte N-terminal de BcMCM afecta su capacidad de hidrólisis de ATP. GST-BcMCM mostró la mitad de capacidad ATPasa respecto a BcMCM. Sin embargo, conserva el efecto estimulante de la presencia de ssADN (Figura 4.26). La proteína GST-BcMCM posee una actividad ATPasa similar a la del dominio helicasa aislado, con la diferencia que mantiene la estimulación a causa del ADN.



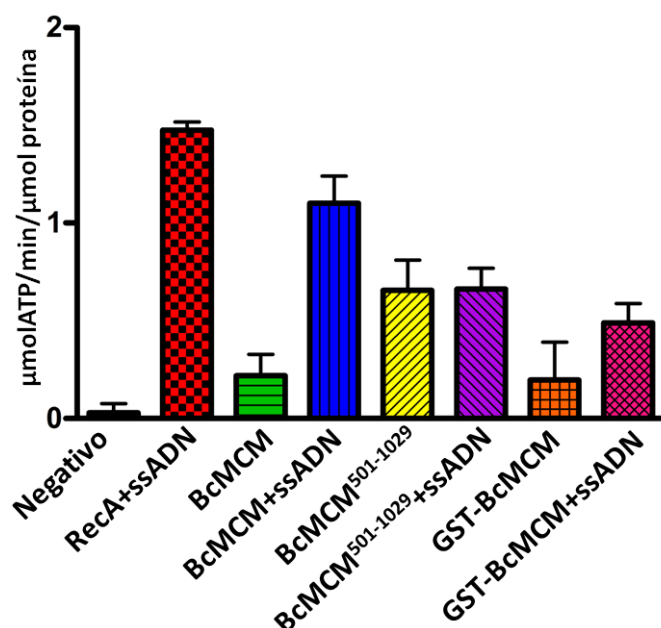


Figura 4.26. Análisis de la hidrólisis de ATP de GST-BcMCM. Se analiza la hidrólisis en presencia y ausencia de ssADN. Se compara con la actividad ATPasa de BcMCM y el dominio helicasa aislado. En las reacciones se utilizó 1 μM de cada proteína. El control negativo es la reacción en ausencia de proteínas y como control positivo se utilizó RecA en presencia de ssADN. Cada ensayo se realizó por triplicado con un valor ATPasa $0,49 \pm 0,1$ $\mu\text{mol ATP/min}/\mu\text{mol proteína}$ para GST-BcMCM en presencia de ADN. En la gráfica se muestra la media de los tres ensayos con su valor de s.e.m.

4.5.7.3. La presencia de la etiqueta seis histidinas-GST disminuye la actividad helicasa de BcMCM

GST-BcMCM es capaz de separar dsADN en forma de horquilla (*Helicasa1-Helicasa2*) o con un extremo 3' libre (*Helicasa1-3' libre*) (Figura 4.27). Al igual que ocurría con la hidrólisis de ATP, añadiendo la etiqueta seis histidinas-GST a BcMCM se observa una disminución en su actividad helicasa.

En conclusión, la etiqueta añadida a la parte N-terminal influye en la función de BcMCM pero mantiene su actividad. Esta influencia negativa puede ser por las interacciones entre los polipéptidos GST de cada monómero. Es posible, que estas interacciones causen cierto cambio en la primasa disminuyendo su efecto estimulante en el dominio helicasa o que la masa extra añadida cause algún impedimento estérico.

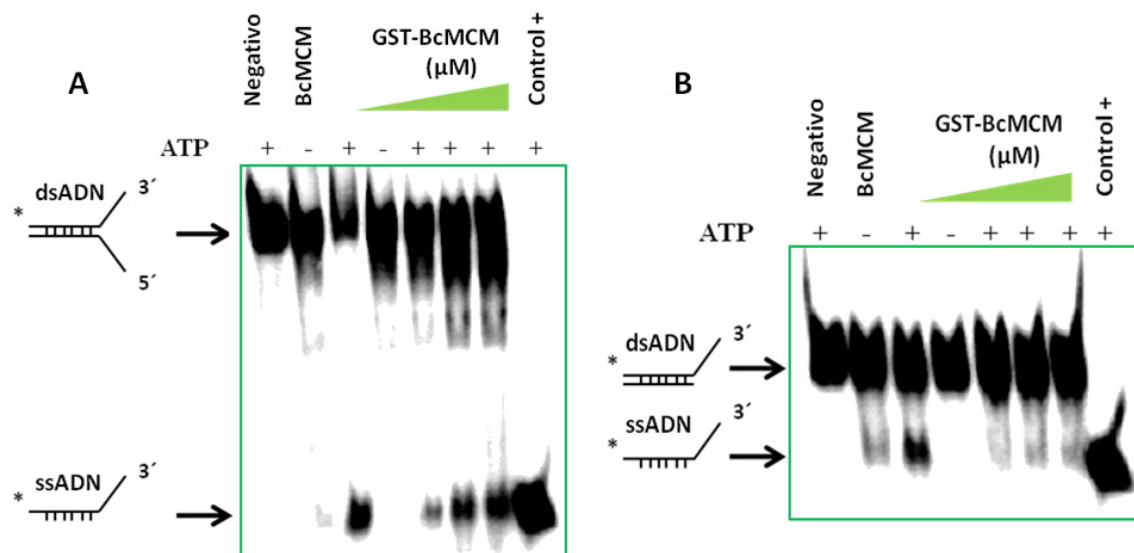


Figura 4.27. Estudio de la actividad helicasa de BcMCM con la etiqueta de seis histidinas y GST en la parte N-terminal. Análisis electroforético del ADN de cadena sencilla desplazado por la acción de GST-BcMCM. Se estudia la actividad helicasa utilizando un sustrato en forma de horquilla replicativa (*Helicase1-Helicase2*) (A) y otro con el extremo 3' libre (*Helicase1-3' libre*) (B). Se indica si la muestra fue incubada o no con 5 mM ATP. Se utilizó un gradiente de concentración de GST-BcMCM desde 0,5 hasta 2 μ M. En el lateral se indica mediante flechas la banda de dsADN sin separar y de ssADN generado tras la separación. La capacidad de la proteína se compara con la actividad de BcMCM sin etiqueta a una concentración de 0,5 μ M. La cantidad de dsADN inicial es de 0,5 nM.

4.6. Caracterización estructural del hexámero BcMCM mediante microscopía electrónica

La microscopía electrónica de transmisión permite determinar la estructura 3D de macromoléculas y complejos macromoleculares. El análisis de partículas individuales por microscopía electrónica se ha convertido en una herramienta muy útil en el área de la biología estructural durante la última década. El análisis de partículas individuales resulta una técnica adecuada para determinar la estructura 3D de grandes complejos macromoleculares implicados en distintos procesos celulares. Tiene la ventaja de resolver estructuras de gran tamaño, con simetría limitada, que contengan zonas flexibles y de las cuales se pueda disponer solo de una pequeña cantidad. Estas son algunas de las limitaciones que pueden impedir la determinación de estructuras a resolución atómica de macromoléculas por métodos cristalográficos. En cambio, el problema de la microscopía electrónica reside en el tamaño límite de las proteínas. Estas deben tener un peso molecular por encima de aproximadamente 100 kDa (Llorca, 2005).



Para el análisis estructural empleando microscopía electrónica, la muestra debe tener unos mínimos requerimientos de pureza, homogeneidad, estabilidad y tamaño. Los estudios biofísicos y bioquímicos previos han demostrado idónea cualidad de la proteína BcMCM. El análisis previo de la oligomerización de BcMCM, demostró su capacidad de hexamerizar en distintas condiciones creando diferentes complejos hexaméricos de pesos moleculares mayores de 700 kDa.

4.6.1. Complejo hexamérico BcMCM en presencia de los nucleótidos ATPγS y ADP

La proteína BcMCM purificada se hexamerizó en presencia de ATPγS formando el complejo BcMCM-ATPγS. El complejo fue aplicado a rejillas de microscopía electrónica cubiertas con una fina capa de carbón previamente ionizadas. Las rejillas se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2 % y se observaron en el microscopio electrónico de transmisión (ver Materiales y Métodos sección 3.7.3.). Las imágenes obtenidas mostraron campos de partículas individuales de tamaño similar y con una distribución homogénea (Figura 4.28A). Se extrajeron varios miles de estas imágenes de partículas individuales de las micrografías y se procesaron con el paquete informático EMAN (Ludtke et al, 1999) y XMIPP (<http://xmipp.cnb.csic.es/>) (Marabini et al, 1996; Sorzano et al, 2004) (Figura 4.28B). Tras un alineamiento libre de patrón y un análisis de simetría rotacional, se clasificaron las partículas para promediar las imágenes pertenecientes a una misma orientación de la molécula. En las medias de dos dimensiones (2D) se identificó la clara presencia de simetría seis (C6) del complejo (Figura 4.28C). La vista superior-inferior simula una flor de seis pétalos con una cavidad central. En la vista lateral, se aprecian dos zonas paralelas de mayor densidad separadas por un espacio. Ambas zonas permanecen conectadas por finos puentes de densidad proteica. Esta estructura del complejo BcMCM muestra similitud a la observada en la arquea MthMCM (Pape et al, 2003) y en el complejo Mcm2-7 de levaduras (Bochman & Schwacha, 2007; Remus et al, 2009; Sato et al, 2000).



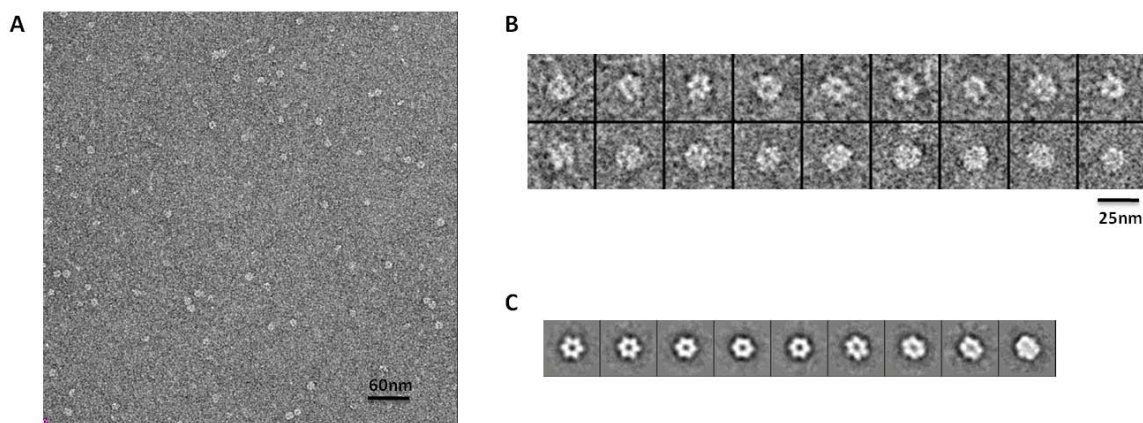


Figura 4.28. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las partículas individuales del complejo BcMCM-ATP γ S. **A.** Micrografía electrónica obtenida a partir de una rejilla incubada con el complejo BcMCM-ATP γ S teñida negativamente. **B.** Galería de partículas individuales correspondientes al complejo, extraídas de micrografías electrónicas como la presentada en A. **C.** Galería de imágenes promedio generadas utilizando el método de clasificación libre de patrón de los paquetes informáticos EMAN (Ludtke et al, 1999) y XMIPP (<http://xmipp.cnb.csic.es/>) (Marabini et al, 1996) (Sorzano et al, 2004).

De la misma manera, la oligomerización de BcMCM en presencia de ADP se evaluó por microscopía electrónica mediante tinción negativa. Para ello, la forma monomérica de BcMCM se incubó en el tampón de hexamerización (ver Materiales y Métodos sección 3.6.1.) en presencia de ADP (5-10 mM). Una vez incubada la reacción a 4° C 16 h, la muestra se aplicó sobre rejillas de microscopía electrónica con una fina capa de carbón ionizadas con anterioridad. Tras teñir negativamente con 2 % de acetato de uranilo, la muestra se observó en el microscopio electrónico. Las imágenes obtenidas mostraban un campo de partículas individuales del mismo tamaño y con buena distribución (Figura 4.29A). La extracción y procesamiento de las imágenes permitieron un promedio de las imágenes pertenecientes a una misma orientación (Figura 4.29B). Las vistas de las medias mostraron la misma vista superior-inferior en forma de flor de seis pétalos con cavidad central que para el hexámero BcMCM formado con ATP γ S. Así mismo, la vista lateral sigue mostrando la existencia de dos zonas paralelas de gran densidad separadas por un espacio. Inicialmente las medias 2D obtenidas, no muestran ningún cambio conformacional aparente a este nivel del complejo BcMCM. Por tanto, tras la hidrólisis de ATP el complejo BcMCM mantiene su estructura homohexamérica sin la disociación a la forma monomérica.



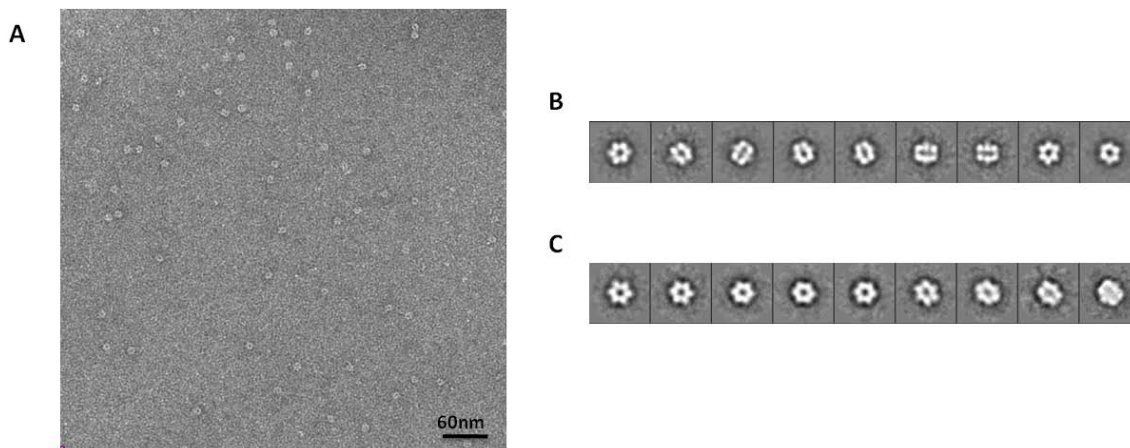


Figura 4.29. Imágenes de partículas individuales del complejo BcMCM-ADP de microscopía electrónica de transmisión. **A.** Micrografía electrónica obtenida de las rejillas incubadas con el complejo BcMCM-ADP y teñidas negativamente. **B.** y **C.** Galería de las medias 2D libres de patrón de los complejos BcMCM-ADP y BcMCM-ATPyS respectivamente. La comparación de las medias de ambos complejos no presenta diferencias apreciables a este nivel.

Se obtuvieron estructuras 3D del complejo BcMCM-ATPyS con y sin simetría aplicada, obteniendo resultados similares para ambas (Figura 4.30). Usando la vista lateral y superior-inferior de las medias 2D y asumiendo una simetría rotacional seis, se construyó un primer modelo inicial. Tras varios ciclos de refinado de este modelo, se obtuvo un volumen final. Este volumen indicó que la proteína BcMCM forma un anillo hexamérico de forma cilíndrica, con un diámetro máximo de 130 Å y una altura de 95 Å. La estructura general consta de seis monómeros de BcMCM dispuestos alrededor de un eje de simetría seis. El anillo muestra un canal central que atraviesa toda la molécula y seis pequeños canales laterales. A pesar de su forma cilíndrica se aprecia una clara asimetría entre la parte superior e inferior de la molécula. El diámetro de la cavidad central es más estrecho en la parte inferior, mientras que se muestra más abierta en la mitad superior (Figura 4.30A y 4.30C). La cavidad central consta de un diámetro de 30 Å en la parte superior y de 40 Å en la parte inferior, suficiente para poder acomodar la doble cadena de ADN. En cambio, los canales laterales de 20 Å, son de un tamaño adecuado para permitir el paso de una cadena simple de ADN a través de ellas. La reconstrucción final del volumen 3D del complejo incluye 3951 imágenes con una resolución aproximada a 30 Å (Figura 36F).

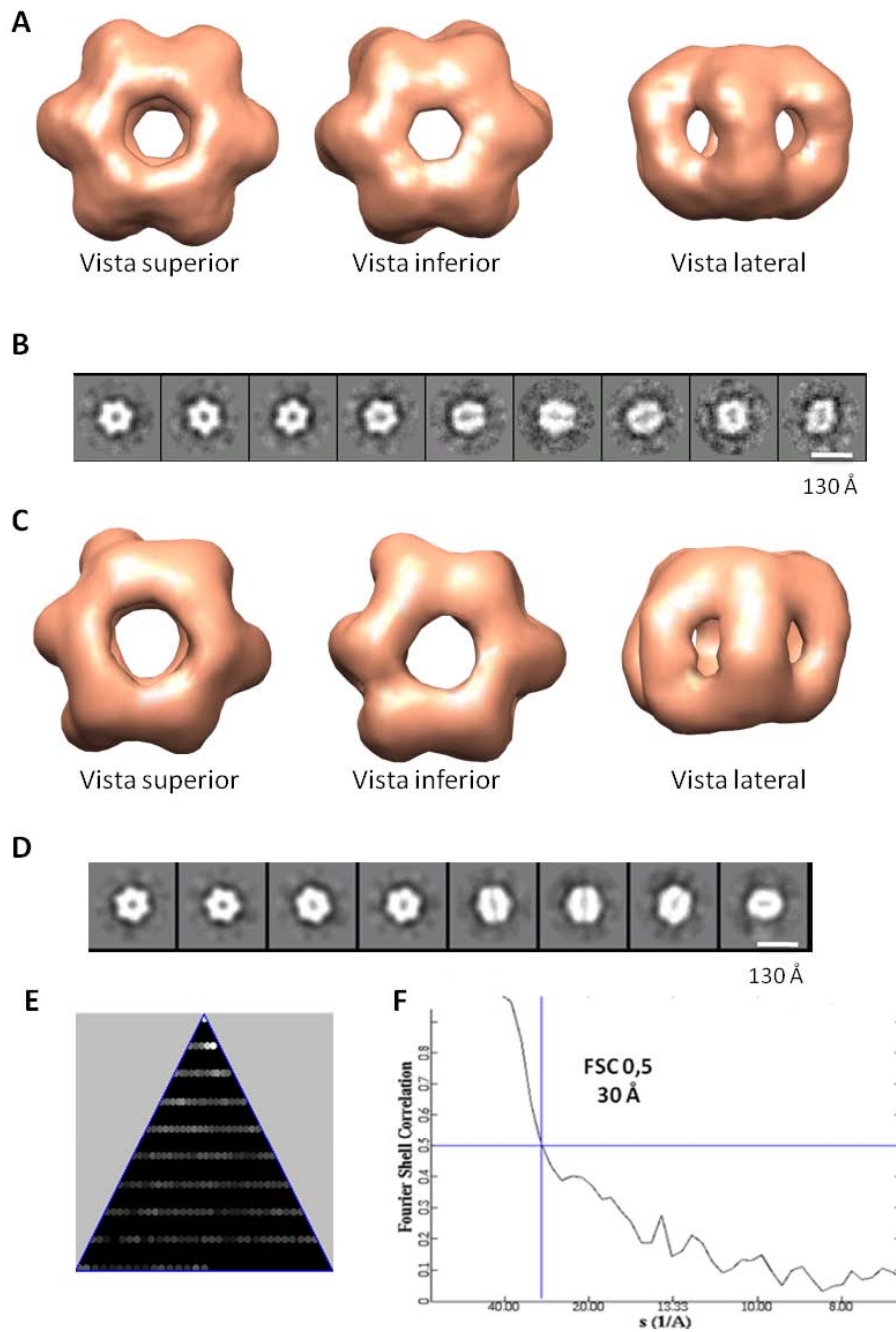
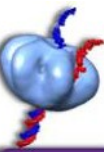


Figura 4.30. Reconstrucción 3D del complejo BcMCM-ATPyS. **A.** Tres vistas del volumen: vista superior, inferior y lateral de la reconstrucción 3D resuelta para el homohexámero BcMCM-ATPyS en ausencia de ADN con simetría C6 aplicada, obtenida a 30 Å de resolución. **B.** Galería de proyecciones del volumen final del complejo BcMCM-ATPyS con simetría C6 aplicada y obtenidas durante el proceso de refinamiento angular iterativo. **C.** Vistas superior, inferior y lateral de la reconstrucción 3D resuelta para el homohexámero BcMCM en ausencia de ADN y sin aplicar simetría. **D.** Galería de proyecciones del volumen final del complejo BcMCM-ATPyS sin simetría obtenidas durante el proceso de refinamiento angular iterativo. **E.** Distribución de los ángulos de Euler del conjunto de partículas individuales en la última iteración del proceso de refinamiento del complejo BcMCM-ATPyS con simetría C6, obtenido mediante el paquete informático EMAN. La claridad de cada punto representa el número de imágenes en cada clase en una escala logarítmica (mayor claridad, representa mayor número de imágenes). **F.** Estimación de la resolución de BcMCM-ATPyS con simetría C6 para un valor de FSC ("Fourier Shell Correlation") de 0,5.



4.6.2. Complejo hexamérico de BcMCM asociado a ssADN

El complejo BcMCM con ADN es más estable que el formado únicamente en presencia del nucleótido, tal y como se ha mostrado anteriormente (sección 4.5.4.3.). La unión de ADN a BcMCM parece reforzar las interacciones entre las seis subunidades del complejo o favorece en el equilibrio de oligomerización hacia la forma hexamérica. Para verificar la existencia del cambio conformacional del complejo BcMCM, se estudió su estructura 3D en presencia de ATPγS y ssADN. La formación y purificación de dicho complejo se llevó a cabo mediante un ensayo con bolas magnéticas acopladas a estreptavidina, “Dynabeads® M280 Streptavidin” (Invitrogen).

4.6.2.1. Purificación del hexámero BcMCM unido a ADN por medio de bolas magnéticas

Las bolas magnéticas acopladas a estreptavidina permiten aislar y purificar moléculas de ADN o complejos ADN-proteína. La molécula que se desea purificar debe estar marcada con biotina. Al incubar la muestra biotinilada con las bolas magnéticas “dynabeads M-280 Streptavidin” (Invitrogen) se establece una interacción específica y estable entre la biotina de la muestra y la estreptavidina de las bolas magnéticas. De esta manera, la muestra marcada se retiene y se consigue separar del resto de los componentes de la mezcla, capturando ADN y el complejo ADN-proteína mediante un magneto. El complejo BcMCM-DNA se separó de las bolas magnéticas mediante la digestión con el enzima de restricción EcoRI.

El complejo hexamérico con ADN se purificó mediante este método para evitar una mezcla de complejos con y sin ADN. Para ello, se diseñó una sonda producto de la hibridación de dos oligonucleótidos en parte complementarios. El primero de ellos, *Biotinilado-EcoRI*, se marcó con biotina en el extremo 5'. Este oligonucleótido contiene además la secuencia del sitio de restricción para EcoRI en la parte central y una cadena sencilla formada de 50 nt de timidina en el extremo 3' (ver Materiales y Métodos sección 3.7.1.). El otro oligonucleótido, *EcoRI complementario*, contiene la secuencia complementaria del sitio de restricción de EcoRI. Una vez oligomerizada la proteína BcMCM con la sonda de ADN, la muestra se incubó durante una hora a 4° C con agitación en presencia de las bolas magnéticas acopladas a estreptavidina. Tras lavar las bolas magnéticas varias veces con el tampón de lavado, se eliminaron los restos de BcMCM sin oligomerizar. Se separaron los complejos unidos a ADN con un imán y mediante la digestión con EcoRI se obtuvo una muestra homogénea de complejos hexaméricos con ADN.



En paralelo se realizó el experimento utilizando la misma reacción de oligomerización de BcMCM pero en ausencia del ADN biotinilado como control negativo.

Las muestras obtenidas en el proceso de la purificación, tanto del control negativo como de la muestra con ADN se resolvieron mediante SDS-PAGE (Figura 4.31). En la elución de la muestra incubada con ADN se observa la banda de la proteína junto con otra banda perteneciente a la enzima de restricción, mientras que en el control negativo solo se detectó la banda de EcoRI. Este experimento permitió la obtención de un complejo homogéneo con ADN, que utilizamos posteriormente para el estudio por microscopía electrónica. A partir de la proteína inicial aplicada se obtuvo aproximadamente un 20 % de ésta como complejo de BcMCM con ADN.

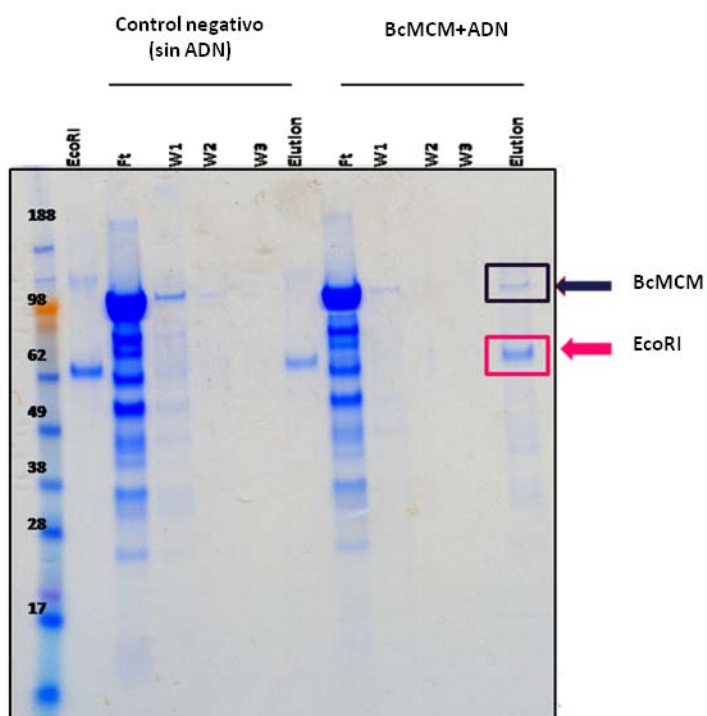


Figura 4.31. Purificación del complejo hexamérico BcMCM y ADN. Los distintos pasos de purificación se resolvieron mediante geles de gradiente de poliacrilamida, 4-12 % SDS-PAGE. La calle denominada EcoRI contiene solamente la enzima de restricción como control, Ft, la muestra no unida a las bolas magnéticas, W1, W2 y W3 corresponden a los lavados y "Elution", al eluato tras la digestión con EcoRI. En la parte derecha en un recuadro están señalizadas con flechas las bandas correspondientes a la enzima EcoRI, en fuxia, y a la proteína BcMCM en morado, en la fracción de la elución.



4.6.2.2. Análisis 3D del complejo BcMCM con ATPyS y ssADN

La muestra obtenida en la purificación con las bolas magnéticas se aplicó sobre rejillas de microscopía electrónica recubiertas con una capa fina de carbón previamente ionizadas. Tras teñirlas negativamente, se visualizaron al microscopio electrónico los complejos hexaméricos simples. En ningún caso se observó la presencia de un doble hexámero de BcMCM. Estudios en arqueas (Costa et al, 2006b; Gomez-Llorente et al, 2005) y en levaduras (Remus et al, 2009) han mostrado la existencia de complejos MCM como doble hexámeros en presencia de dsADN.

Sin embargo, el estudio de microscopía electrónica de tinción negativa del complejo BcMCM en presencia de dsADN mostró únicamente estructuras de hexámeros simples.

Para la resolución de la estructura 3D a baja resolución del complejo BcMCM-ATPyS-ADN se recolectaron 5748 imágenes del complejo BcMCM-ATPyS-ADN teñidas negativamente. Se utilizó una mezcla de las imágenes recogidas con y sin inclinación del porta-muestras (Figura 4.32A y 4.32B). Los promedios libres de patrón mostraron una apariencia similar a las medias 2D del complejo sin ADN (Figura 4.32C). De nuevo la vista superior-inferior de las medias toma la forma de una flor con seis pétalos. Sin embargo, en esta ocasión la presencia de los seis monómeros es más destacada y evidente. La vista lateral 2D parece no mostrar ningún cambio conformacional detectable al compararlo con la del complejo sin ADN.

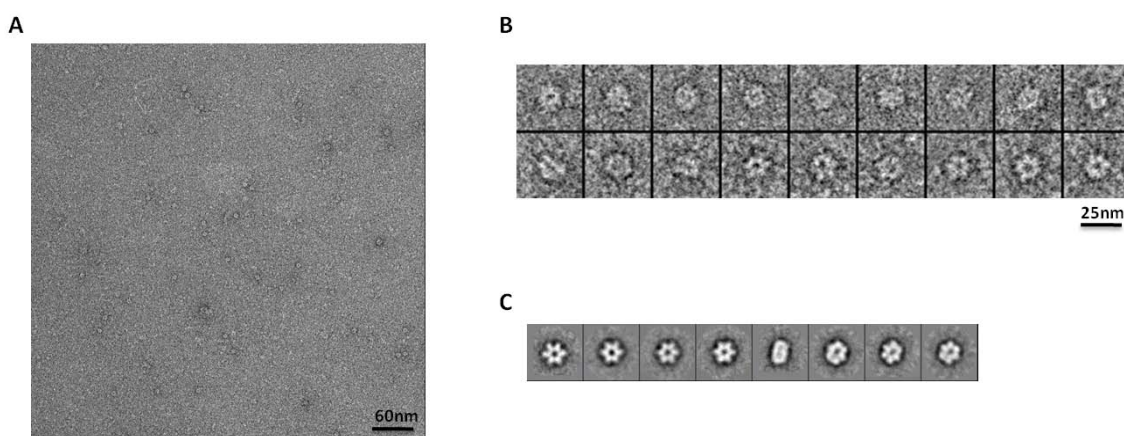


Figura 4.32. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las partículas individuales del complejo BcMCM-ATPyS-ADN. **A.** Micrografía electrónica obtenida a partir de una rejilla incubada con el complejo BcMCM con ADN teñida negativamente. **B.** Galería de partículas individuales extraídas de micrografías electrónicas que corresponden al complejo BcMCM-ATPyS-ADN. **C.** Galería de imágenes medias generadas utilizando el método de clasificación libre de patrón de los paquetes informáticos EMAN y XMIPP.

Utilizando 4618 partículas de las 5748 iniciales, se generó el modelo 3D del complejo a una resolución aproximada de 28 Å. En el procesamiento de las imágenes para la formación del modelo inicial se asumió desde el inicio la simetría rotacional seis. Posteriormente, el volumen inicial fue refinado aplicando la simetría C6 durante el proceso de refinamiento (Figura 4.33A y 4.33B). En paralelo, se realizó el refinamiento del modelo inicial con ADN sin aplicar ninguna simetría (Figura 4.33C y 4.33D). El resultado de ambos procesos fue similar (Figura 4.33A y 4.33C). La estructura 3D del complejo BcMCM-ATPyS-ADN muestra un cambio conformacional respecto a la forma de barril del complejo BcMCM-ATPyS en ausencia de ADN. Una vez asociada la proteína al ADN, se observó un movimiento de los extremos de los monómeros hacia la cavidad central, junto con la flexión de las subunidades. Como resultado del cambio

conformacional, las entradas al hueco central del anillo en la parte superior e inferior reducen su tamaño hasta 35 Å y 25 Å respectivamente, y a su vez, la altura del complejo disminuye desde 95 Å a 80 Å.

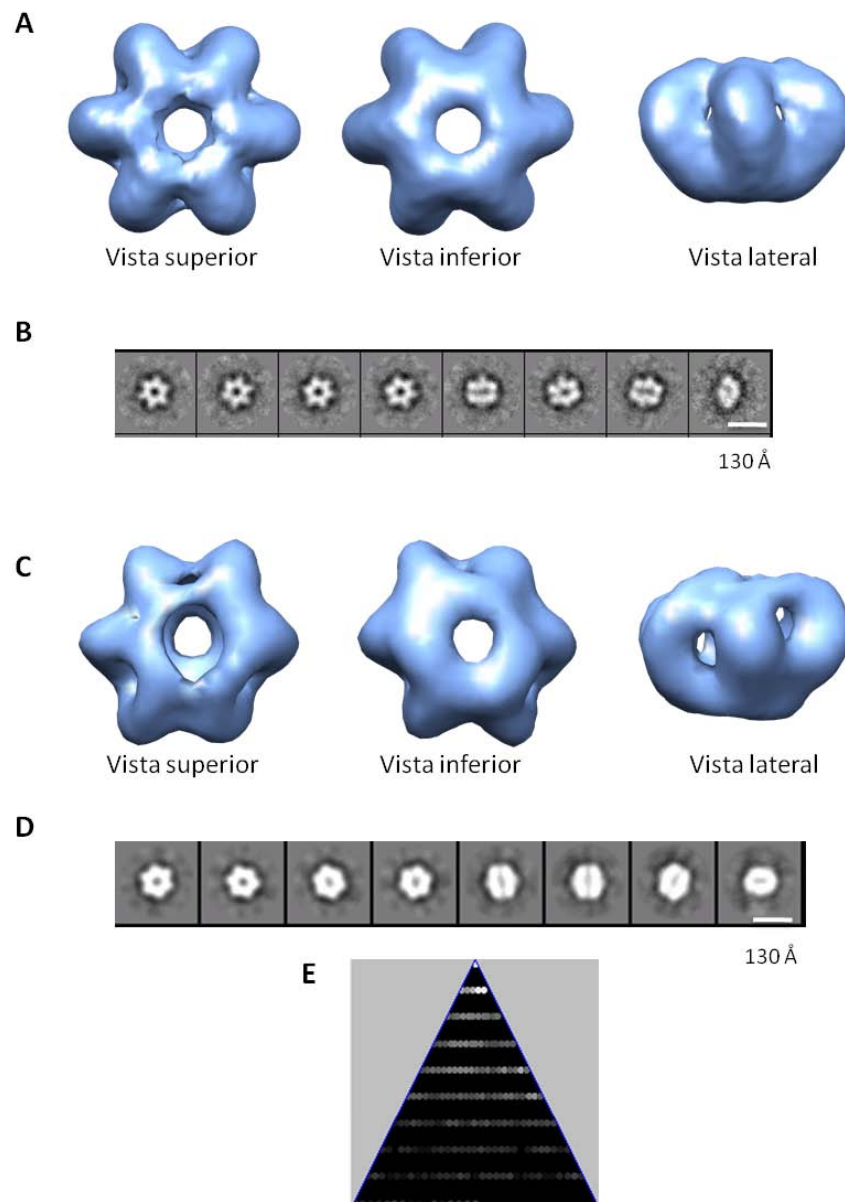
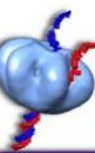


Figura 4.33. Reconstrucción 3D del complejo BcMCM-ATPyS-ADN. **A.** Estructura 3D del complejo BcMCM con ADN con simetría C6 aplicada. Se muestran las tres principales vistas: superior, inferior y lateral. Se aprecia la diferencia entre la vista superior e inferior en el tamaño del hueco central, siendo mayor el diámetro en la vista superior. **B.** Galería de las proyecciones del volumen final del complejo BcMCM-ATPyS-ADN con simetría C6. **C.** Estructura 3D del complejo BcMCM-ATPyS-ADN sin simetría aplicada. Se muestran tres vistas del volumen con características similares a las de con simetría aplicada. **D.** Galería de las proyecciones de la estructura 3D sin simetría generada en la última iteración del proceso de refinamiento angular. **E.** Representación por el paquete informático EMAN de la distribución de los ángulos de Euler de los promedios obtenidos en la última iteración del procesamiento del complejo BcMCM-ATPyS-ADN. La claridad de cada punto representa el número de imágenes en cada clase en una escala logarítmica (mayor claridad, representa mayor número de imágenes).



Debido a los impedimentos de la técnica de tinción negativa no se observó la densidad de la molécula de ADN en la reconstrucción 3D del complejo. Asumiendo que la corta cadena de ADN utilizada en el ensayo (50 nt) se encuentra atravesando la cavidad central del hexámero, el ADN quedaría rodeado por las seis subunidades. A pesar del cambio conformacional, los canales laterales conservan un tamaño adecuado para el paso a través de ellos de ssADN.

4.6.3. Localización de los dominios helicasa y primasa en la estructura 3D de BcMCM

Para asignar la posición de cada dominio dentro de la estructura en forma de barril de BcMCM, se obtuvo la estructura 3D del hexámero con el dominio primasa marcado en la parte N-terminal. Para ello, se purificó la proteína BcMCM sin eliminar la etiqueta seis histidinas-GST con la que se expresa en la parte N-terminal (GST-BcMCM). Las seis histidinas aportan unos 700 Da al peso molecular de la proteína, sin embargo, la proteína GST añade 27 kDa de masa por subunidad. Por tanto, la masa extra (166,2 kDa) debería ser suficiente para visualizar la localización de la parte N-terminal en el volumen 3D de BcMCM.

Como se ha descrito anteriormente, el dominio helicasa aislado puede formar hexámeros, mientras que no se han observado hexámeros para el dominio primasa. Las muestras puras de cada dominio se incubaron en el tampón de oligomerización y luego, fueron aplicadas a las rejillas de microscopía electrónica y teñidas con tinción negativa antes de observarlas con el microscopio electrónico. Mientras que en las rejillas con BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ se visualizaban partículas individuales con la misma vista superior-inferior que la BcMCM, en la muestra BcMCM¹⁻³⁶¹ no se distinguió ninguna partícula individual. El hexámero del dominio primasa con 240 kDa de peso molecular está dentro del margen de visualización del microscopio electrónico. En cambio, las formas monoméricas del dominio helicasa, BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹, de 60 kDa y primasa, BcMCM¹⁻³⁶¹, de 40 kDa, están por debajo del límite de visualización del microscopio electrónico.

Por otro lado, la muestra obtenida de la purificación de GST-BcMCM se hexamerizó en presencia de ADN empleando las bolas magnéticas acopladas a estreptavidina. Después de la incubación y tras la digestión con EcoRI, se obtuvo el complejo hexamérico GST-BcMCM-ATPγS-ADN. El complejo, tras ser teñido negativamente, se observó con el microscopio electrónico. La clasificación libre de patrón de las imágenes reveló una vista superior-inferior característica con la forma de flor de seis pétalos con una cavidad central (Figura 4.34). La vista



lateral resultó ser parecida a la de BcMCM con dos zonas similares de gran densidad situadas en paralelo. Estas dos zonas se encuentran separadas por un espacio y conectadas por finos puentes de densidad proteica. Mientras que la vista superior-inferior se asemeja a la vista caracterizada para la BcMCM sin etiqueta, la vista lateral de GST-BcMCM muestra una densidad de mayores dimensiones que el complejo sin etiqueta.

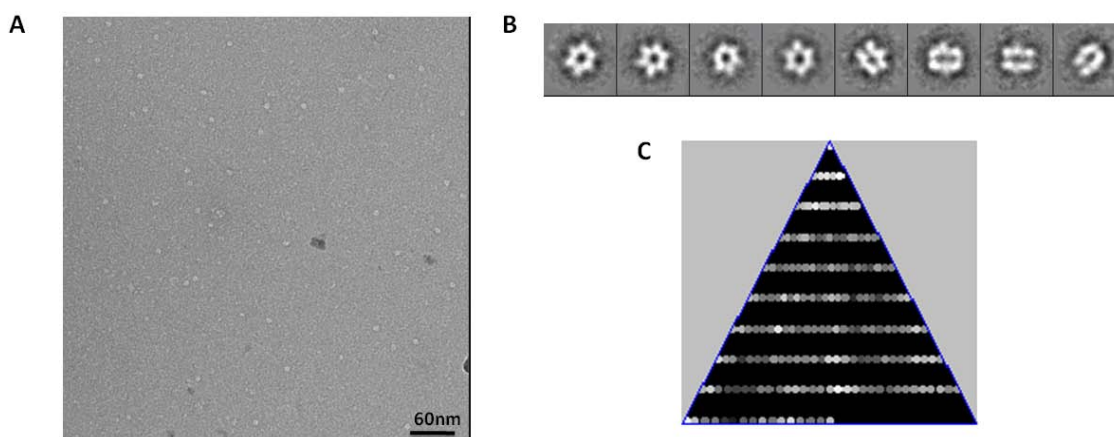


Figura 4.34. Imágenes de microscopía electrónica de partículas individuales del complejo GST-BcMCM-ATPyS-ADN. **A.** Micrografía electrónica obtenidas a partir de las rejillas del complejo GST-BcMCM con ADN teñidas negativamente. **B.** Galería de las medias 2D de complejo GST-BcMCM-ATPyS-ADN obtenidas tras la clasificación libre de patrón. **C.** Distribución de los ángulos de Euler de los promedios obtenidos para el complejo GST-BcMCM con ADN usando el modo de representación utilizado por el paquete informático EMAN. La claridad de cada punto representa el número de imágenes en cada clase en una escala logarítmica (mayor claridad, representa mayor número de imágenes)

Partiendo de medias 2D se construyó un modelo inicial con simetría C6. Tras varios pasos de refinamiento, se generó la reconstrucción del modelo 3D de GST-BcMCM sin aplicar simetría (Figura 4.35). La estructura mostró de nuevo un anillo simple con una cavidad central y seis canales laterales que separan las subunidades. Tal y como se apreciaba en las medias 2D, la altura de GST-BcMCM es mayor que la de la proteína sin etiqueta. La masa agregada por la etiqueta se sitúa en un extremo del modelo. La comparación visual de la estructura sin etiqueta indica que la molécula no es simétrica. Uno de los lados, tiene el hueco central más estrecho y la simetría seis es más evidente. En el otro lado del anillo (la parte superior), la forma de barril tiende a abrirse ligeramente. Teniendo en cuenta que el dominio helicasa tiende a formar hexámeros y dado que la primasa posiblemente no oligomeriza, es razonable considerar que el dominio BcMCM¹⁻³⁶¹ se sitúa en la parte superior de la molécula donde desaparece la simetría seis.

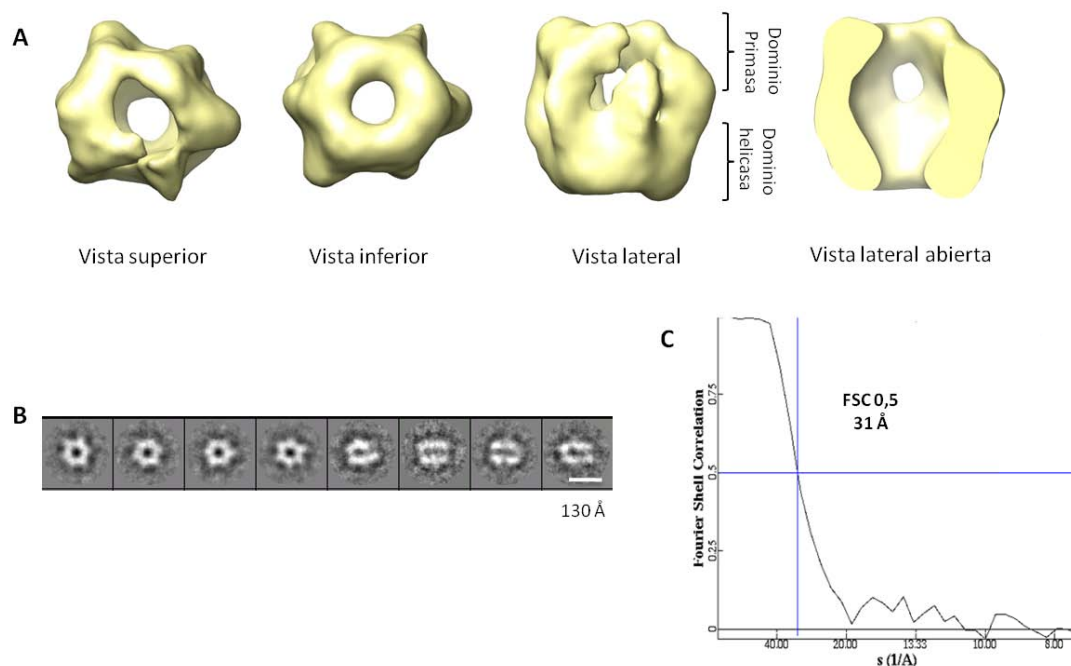


Figura 4.35. Estructura 3D del complejo GST-BcMCM-ATP γ S-ADN. A. Se muestran las tres principales vistas: superior, inferior y lateral del complejo GST-BcMCM con ADN sin simetría seis, y la vista lateral abierta por la mitad. Mientras que la vista inferior conserva la simetría seis, en la vista superior esta simetría desaparece. La asignación de los dominios se muestra en la vista lateral. B. Galería de proyecciones de la estructura 3D final del complejo sin simetría. C. Estimación de la resolución para un valor de FSC 0,5 a 31 Å.

4.6.4. Marcaje con estreptavidina-oro de la molécula de ADN en el complejo BcMCM

La estructura en forma de anillo que presentan las helicasas posibilita diferentes formas de unión al ADN. El ADN puede unirse de manera que atraviesa la cavidad central o puede unirse por fuera del anillo. Otra posibilidad es que se una en ambos sitios. Hasta el momento, la mayoría de los estudios revelan la unión del ADN en la cavidad central de la helicasa. En las MCM arqueas se han encontrados horquillas β en el interior del canal que han sido asociadas con la unión del ADN mediante estudios de mutagénesis dirigida (Brewster et al, 2010; Fletcher et al, 2003; McGeoch et al, 2005). El hecho de que la cavidad central de estas helicasas acomode ssADN o dsADN en su interior apoya la idea del paso del ADN por su cavidad interna (Liu et al, 2008; Costa & Onesti, 2009). La mayoría de los mecanismos propuestos consideran el paso de la molécula de ADN, ya sea una de las hebras o ambas, por la cavidad central. Las evidencias de la interacción del ADN por la región exterior del complejo son escasas (Costa et al, 2008) y controvertidas.

Debido a la limitación de la tinción negativa para visualizar la densidad del ADN, se diseñó otra estrategia para poder obtener información sobre su situación en el complejo. Se marcó el ADN con oro en el extremo 5' de la sonda para poder visualizarlo. La localización del marcaje oro-estreptavidina en la parte superior-inferior o a un lado de la vista lateral de BcMCM, definirá la disposición del ADN atravesando la cavidad central o interaccionando con la parte externa del complejo respectivamente. Las moléculas de ssADN marcadas con biotina se incubaron con las partículas de oro-estreptavidina. Tras purificar las moléculas ssADN-oro utilizando las bolas magnéticas acopladas a estreptavidina (ver Materiales y Métodos sección 3.7.2.), se incubaron con la proteína BcMCM en condiciones de hexamerización con el nucleótido ATPγS. La muestra fresca de los hexámeros con el ADN-oro se observó con el microscopio electrónico tras la tinción negativa de la muestra. Las imágenes extraídas de las micrografías muestran partículas individuales del complejo hexamérico BcMCM junto a la molécula de oro (Figura 4.36). La partícula de oro empleada es de 5 nm, demasiado grande respecto al tamaño del complejo. Por tanto, no se pudo concretar la posición de la molécula de ADN en el complejo BcMCM, pero se confirmó de nuevo la presencia de ADN en el complejo. Para abordar el problema del tamaño de las partículas de oro, se realizó el ensayo de marcaje con la partícula de estreptavidina-oro de 1,4 nm, "Nanogold® (Nanoprobes)". Sin embargo, por el microscopio electrónico no se consiguió distinguir la partícula de oro del fondo de la muestra teñida negativamente.

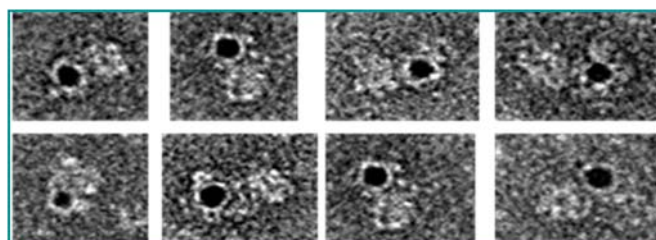


Figura 4.36. Galería de la selección de imágenes individuales del complejo BcMCM-ATPγS-ADN marcado con oro. Imágenes de las partículas individuales del complejo BcMCM incubados con 5 nm estreptavidina-Oro:ADN. El punto negro intenso corresponde al marcaje estreptavidina-oro.





5. Discusión

5.1. La co-regulación primasa-helicasa

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína BcMCM además del dominio C-terminal AAA+ ATPasa, contiene un dominio primasa en su N-terminal. Este dominio muestra una baja homología con la subunidad catalítica de la ADN primasa de arqueas y eucariotas. Se ha descrito la localización del dominio primasa en los primeros 200 aminoácidos de BcMCM, con los Aspárticos característicos del centro catalítico y el sitio de unión de nucleótidos (NTP) (Iyer et al, 2005; McGeoch & Bell, 2005). Este dominio conserva la estructura de la superfamilia arqueo-eucariota primasa (AEP). La naturaleza de la combinación estructural primasa-helicasa recuerda a la proteína del bacteriófago T7 (gp4). La proteína primasa-helicasa de T7 está estrechamente relacionada con DnaG y DnaB de *E. coli* (Frick & Richardson, 2001), mientras que BcMCM es un híbrido que guarda homología con la MCM eucariotas y la ADN primasa de arqueas (Iyer et al, 2005; McGeoch & Bell, 2005). En ambas proteínas bifuncionales primasa-helicasa, T7 y BcMCM, la hexamerización del dominio helicasa da lugar a la presencia de seis primasas en un mismo complejo (Guo et al, 1999). Generalmente, la mayoría de las helicasas replicativas son hexaméricas. Sin embargo, las primasas suelen ser monoméricas. El dominio helicasa, BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹, hexameriza en las mismas condiciones que la proteína BcMCM. No obstante, para el dominio primasa, BcMCM¹⁻³⁶¹, no se han observado oligómeros. BcMCM en presencia de ssM13, como ADN molde, y ribonucleótidos sintetiza fragmentos de ARN. La actividad primasa del mutante K653A, que carece de la capacidad de oligomerizar, indica que BcMCM es capaz de sintetizar cebadores de ARN como monómero. Por lo tanto, la proteína monomérica BcMCM es activa como primasa aunque su actividad helicasa sea nula. Este comportamiento también se ha observado en la primasa-helicasa T7 (Kato et al, 2001; Kuchta & Stengel, 2010).

Cabe destacar que el dominio BcMCM¹⁻³⁶¹ no sintetizó fragmentos de ARN en las mismas condiciones en las que lo hace la forma monomérica de BcMCM. Los ensayos de retardo realizados con BcMCM¹⁻³⁶¹ no mostraron la aparición de alguna banda que revelase su interacción con ADN. Es razonable pensar que sin la unión al ADN de molde la proteína no pueda sintetizar cebadores. Por otro lado, con 30 aminoácidos más la construcción BcMCM¹⁻³⁹⁹ interacciona con ssADN (Samuels et al, 2009). Esto plantea dos posibilidades. Una primera, en la que los 30 aminoácidos demás de la construcción BcMCM¹⁻³⁹⁹ sean esenciales para la unión a ADN o para permitir una conformación de la proteína que permita interaccionar con el ADN. La segunda, que la primasa necesite de la presencia del dominio helicasa para localizar la zona del ADN donde debe sintetizar los cebadores. Generalmente, entre las primasas y helicasas se



genera una interacción que produce una co-regulación de la función de ambas. Esta asociación primasa-helicasa se da tanto en los casos en que ambas se encuentren en un mismo polipéptido (por ejemplo, BcMCM y la primasa-helicasa T7), como en los casos de una unión no covalente entre las dos proteínas (por ejemplo, el complejo DnaG-DnaB de *E. coli*) (Bird et al, 2000).

En varias especies, como en *E. coli*, la helicasa favorece la síntesis de cebadores de ARN por la primasa, la localización del ADN donde se debe iniciar la síntesis y la longitud del fragmento de ARN sintetizado (Bhattacharyya & Griep, 2000; Johnson et al, 2000; Tougu et al, 1994). Además, DnaG estimula la actividad ATPasa y la helicasa de DnaB (Bird et al, 2000; Corn & Berger, 2006). La estimulación de un dominio helicasa a la actividad primasa también ha sido demostrada en la proteína bifuncional T7 (Frick et al, 1998; Frick & Richardson, 1999). Así mismo, la unión de la primasa al ADN de molde es muy débil sin la presencia de la helicasa (Frick & Richardson, 1999). La asociación primasa-helicasa, no es exclusiva de organismos procariotas. Hay evidencias de la interacción física entre la helicasa LTag y el complejo polimerasa α /primasa de SV40 en células mamíferas infectadas por el virus SV40. Esta interacción se da entre LTag, la subunidad p180 de la polimerasa α y la subunidad B (Collins et al, 1993; Dornreiter et al, 1990; Dornreiter et al, 1993). Las consecuencias de la interacción en la actividad primasa son similares a las observadas en procariotas (Collins & Kelly, 1991). En eucariotas no se ha detectado una interacción directa entre el complejo Mcm2-7 y el complejo polimerasa α /primasa (Marinsek et al, 2006). Sin embargo, se ha observado en arqueas la interacción entre GINS y la primasa (Marinsek et al, 2006). Este mismo modelo de comunicación entre MCM y el complejo polimerasa α / primasa se ha propuesto en eucariotas (Marinsek et al, 2006), donde el complejo CMG, compuesto por Cdc45-Mcm2-7-GINS, jugaría el papel de helicasa replicativa. Los datos en arqueas sugieren que GINS conectaría el complejo α / primasa con la helicasa replicativa, generando una interacción primasa-helicasa existente en otras especies, aunque probablemente de manera más compleja.

Esta estimulación de la helicasa sobre la primasa, justificaría el resultado negativo de la síntesis de fragmentos de ARN del dominio BcMCM¹⁻³⁶¹ y su incapacidad para interaccionar con ssADN. La helicasa puede facilitar a la primasa de BcMCM la localización en el ADN donde sintetiza los cebadores. Por otro lado, el dominio helicasa aislado, BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹, mostró ciertas diferencias con respecto a la proteína BcMCM completa. BcMCM tiene una actividad ATPasa que se estimula en presencia de ssADN (Samuels et al, 2009), igual que las MCM arqueas (Jenkinson & Chong, 2006; Sakakibara et al, 2009b). Sin embargo, BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹

hidroliza ATP independientemente del estímulo de ADN. La capacidad de hidrólisis del dominio helicasa solo, es la misma en presencia o ausencia de ADN, siendo menor que para BcMCM cuando está estimulada por ssADN. Además, BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ desenrolla el ADN con la misma polaridad 3'-5' y en la misma condición dependiente de glutamato, pero con una menor capacidad. Por lo tanto, la cantidad de ssADN desplazado es menor cuando la helicasa no interacciona con la primasa. Esta disminución en la actividad tanto ATPasa como helicasa puede ser debida a la falta de co-regulación entre ambas proteínas. La presencia del dominio primasa en BcMCM estimula la hidrólisis de ATP y el desenrollamiento de la doble hélice del dominio helicasa, y transforma la actividad ATPasa en un proceso dependiente de ADN. La unión a ADN del dominio helicasa no sufre ningún cambio aparente por la presencia o ausencia de la primasa.

5.2. Estructura 3D del homohexámero BcMCM

BcMCM se purificó en su forma monomérica, tal y como se había descrito con anterioridad (Samuels et al, 2009). Sin embargo, BcMCM es activa tras formar hexámeros, como ocurre en la mayoría de las helicasas replicativas. La proteína BcMCM forma complejos hexaméricos en presencia de ATP y Mg^{2+} . Para la formación de los complejos es necesaria la asociación al nucleótido. La mayoría de los ensayos se han llevado a cabo en presencia de ATPγS. Otras helicasas como el subcomplejo Mcm4/6/7 de *S. cerevisiae* (Ma et al, 2010) y LTag de SV40 (Dean et al, 1992) han mostrado la misma dependencia del nucleótido para su oligomerización. La abolición de la asociación al ATP, mediante la mutación K653A en el motivo Walker A, impide la oligomerización y por lo tanto, afecta la actividad de BcMCM. Sin embargo, el complejo Mcm2-7 de eucariotas permanece en su forma hexamérica tras mutar este mismo residuo en el motivo Walker A de las seis subunidades (Bochman & Schwacha, 2007). Además, el análisis del estado de oligomerización mediante microscopía electrónica ha revelado que la proteína en presencia de ADP también forma hexámeros. Estos resultados indican que tras la hidrólisis de ATP a ADP, el complejo mantendría su estado oligomérico. La formación de estos complejos se da en presencia o ausencia de ADN. La presencia de ADN estabiliza el complejo mediante un cambio conformacional en la molécula que se observa al comparar las estructuras 3D del complejo en ausencia y presencia de ADN.



5.2.1. Complejo BcMCM-ATPyS

La estructura 3D obtenida mediante microscopía electrónica del complejo BcMCM con ATPyS, reveló un anillo hexamérico con una cavidad central similar a las estructuras observadas para los homólogos MthMCM en arqueobacterias (Pape et al, 2003) y el complejo Mcm2-7 en levaduras (Bochman & Schwacha, 2007; Remus et al, 2009; Sato et al, 2000). Las medias 2D obtenidas tras la clasificación libre de patrón mostraron desde el inicio una clara simetría C6. La vista superior-inferior recuerda a una flor de seis pétalos con una cavidad central. La vista lateral muestra dos zonas de mayor densidad proteica dispuestas en paralelo y separadas por un espacio. Ambas zonas están conectadas por finos puentes de densidad proteica. Se generaron volúmenes 3D, con simetría C6 y sin simetría aplicada, del complejo BcMCM-ATPyS a una resolución aproximada de 30 Å, con resultados similares. La estructura general consta de seis monómeros de BcMCM dispuestos alrededor de un eje de simetría seis. El anillo muestra un canal central, que atraviesa toda la molécula, y seis pequeños canales laterales, que separan las subunidades BcMCM. A pesar de la forma cilíndrica de la estructura, se aprecia una clara asimetría entre la parte superior e inferior de la molécula. El diámetro del hueco central es más estrecho en la parte inferior, mientras que en la parte superior es más amplio. Las dimensiones aproximadas del complejo son de 130 Å de diámetro total y 95 Å de altura, con un diámetro de la cavidad central de aproximadamente 40 Å en la parte superior y 30 Å en la mitad inferior, suficiente para acomodar la doble cadena de ADN. El diámetro de los canales laterales próximos a 20 Å es el adecuado para permitir el paso de una molécula de ssADN.

5.2.2. Cambio conformacional estimulado por el ADN

Las medias 2D generadas del complejo BcMCM-ATPyS y ssADN mostraron en un principio pequeñas diferencias con respecto a las del complejo en ausencia de ADN. Las vistas superiores-inferiores de BcMCM-ATPyS-ADN revelaron la flor de seis pétalos con cavidad central, donde las seis subunidades BcMCM están más definidas que en las medias 2D del complejo BcMCM-ATPyS. Por otro lado, la vista lateral no reveló ningún cambio apreciable respecto a lo observado en el complejo sin ADN. El volumen 3D del complejo BcMCM-ATPyS-ADN mostró un cambio conformacional en la estructura en forma de barril del complejo BcMCM-ATPyS, por la interacción con el ssADN. La estructura en presencia de ADN sigue siendo asimétrica, presentando la diferencia de tamaño entre los diámetros del hueco central en la parte superior y la mitad inferior del complejo. Como consecuencia de la unión a ADN, los

diámetros de la cavidad central disminuyen en ambos lados, siendo aproximadamente de 25 Å en el lado inferior y 35 Å en el lado superior del complejo. Las dimensiones del volumen también varían, siendo aproximadamente 130 Å de diámetro total y 80 Å de altura. El mecanismo del cambio conformacional aparece esquematizado en la figura 5.1. La presencia de ADN produce un movimiento de los extremos de los monómeros hacia la cavidad central junto con la flexión de las subunidades. Este achatamiento del complejo produce un acercamiento hacia la molécula del ADN. Debido a los impedimentos de la técnica de tinción negativa, no se observa la densidad de la molécula de ADN en la reconstrucción 3D del complejo. Asumiendo que la cadena de ssADN utilizada para la formación del complejo atraviesa la cavidad central, el ADN quedaría rodeado por las seis subunidades del complejo. La interacción con el ADN refuerza las interacciones existentes entre los seis monómeros del complejo, aumentando como consecuencia la estabilidad del complejo, tal y como se ha comprobado por gel filtración (Resultados, sección 4.5.4.3.). A pesar del cambio conformacional, los canales laterales conservarían un tamaño adecuado para el paso de ssADN. Este tipo de cambios conformacionales generados por la presencia de ADN, se han observado en otras helicasas como MthMCM (Costa et al, 2006a) y en LTag de SV40 (VanLoock et al, 2002).

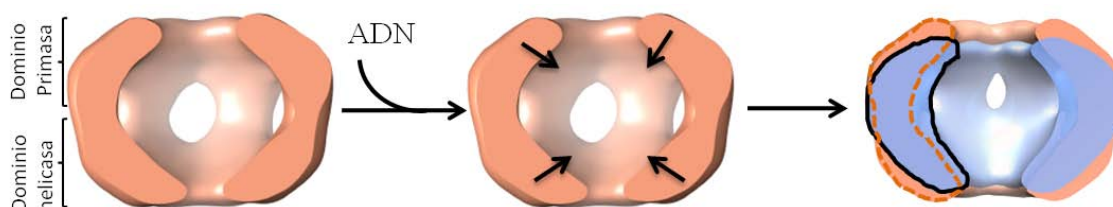


Figura 5.1. Mecanismo del cambio conformacional inducido por la unión a ADN. Se muestra la vista lateral abierta del complejo BcMCM-ATPyS, con la asignación de los dominios en la parte izquierda. Tras la asociación del ADN, las subunidades empiezan a flexionarse y los monómeros se acercan hacia la cavidad central, donde se situaría la molécula de ADN. Las flechas negras representan el movimiento de las subunidades. En la última imagen se superponen la estructura 3D del complejo BcMCM-ATPyS y BcMCM-ATPyS-ADN, con la vista lateral abierta por la mitad. La molécula del complejo BcMCM-ATPyS se representa en color salmón y en azul el complejo BcMCM-ATPyS-ADN.

El marcaje con la etiqueta compuesto por seis histidinas-GST (166,2 kDa de masa extra por hexámero) en la parte N-terminal de BcMCM y la reconstrucción del volumen 3D de GST-BcMCM posibilitó la localización de los dominios primasa y helicasa dentro de la estructura 3D de BcMCM. La etiqueta de las seis histidinas y GST se situó en uno de los extremos dentro de la estructura 3D. Se obtuvieron medias 2D por clasificación libre de patrón de las partículas individuales del complejo GST-BcMCM-ATPyS-ADN. La vista superior-inferior del complejo



incluyendo la etiqueta seis histidinas-GST, no mostró ninguna diferencia aparente con respecto al complejo BcMCM-ATPyS-ADN. Sin embargo, en la vista lateral la molécula presentaba una mayor altura que el complejo en ausencia de etiqueta. La comparación visual de las estructuras 3D con y sin etiqueta indica diferencias importantes (Figura 5.2). En el volumen con etiqueta, en uno de los lados (la parte inferior), el hueco central es más estrecho y conserva la simetría seis. En cambio, la estructura de barril tiende a abrirse en la parte superior de la molécula rompiendo la simetría C6 de BcMCM. Por otro lado, el dominio helicasa BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ forma hexámeros, mientras que, el dominio primasa aparentemente no oligomeriza. En consecuencia, la parte que mantiene la simetría seis correspondería al dominio helicasa. Por lo tanto, la presencia de seis dominios primasa en el complejo BcMCM es producto de la capacidad de hexamerización del dominio helicasa, dada la presencia de ambos dominios en el mismo polipéptido.

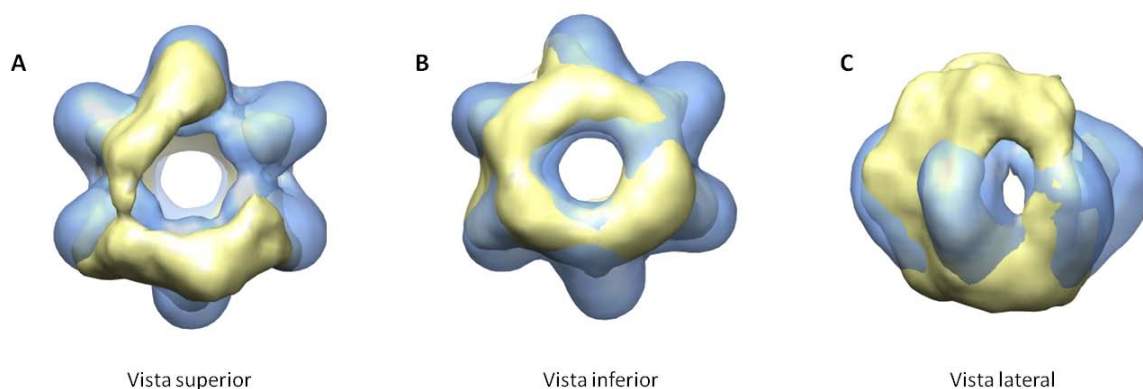


Figura 5.2. Superposición de las estructuras 3D de los complejos BcMCM-ATPyS-ADN y GST-BcMCM-ATPyS-ADN.

Imágenes de la superposición del complejo BcMCM en presencia de ADN aplicando simetría C6 y del GST-BcMCM en presencia de ADN en ausencia de simetría. Se muestran las tres vistas características: superior (A), inferior (B) y lateral (C). El complejo BcMCM-ATPyS-ADN está coloreado en azul y GST-BcMCM en amarillo.

Los ensayos bioquímicos han confirmado que la proteína GST-BcMCM es activa a pesar de la masa extra añadida en la parte N-terminal. Sin embargo, la etiqueta ha influido en la funcionalidad de BcMCM, reduciendo levemente su actividad ATPasa y helicasa. La influencia negativa de la etiqueta puede ser una consecuencia de las interacciones entre los polipéptidos GST de cada monómero. Es posible, que estas interacciones causen cierto cambio en la primasa, disminuyendo su efecto estimulante en el dominio helicasa o que la masa extra añadida cause algún impedimento estérico. Otra posibilidad es la formación de dímeros de BcMCM inducidos por la GST, ya que GST forma dímeros. De esta manera, la cantidad de BcMCM dimerizada no formaría parte de los complejos hexaméricos BcMCM, disminuyendo el número de complejos activos en la muestra.

5.2.3. Ensamblaje del complejo BcMCM sobre el ADN

La proteína BcMCM, al igual que las MCM de arqueas, une ADN independientemente de la presencia de ATP, creando la interacción BcMCM monómero-ADN. Sin embargo, se ha demostrado la dependencia de ATP en la formación del complejo Mcm2-7-ssADN (Bochman & Schwacha, 2007). La presencia de ATP en el tampón donde está presente el complejo monomérico BcMCM-ADN, estimula la oligomerización de BcMCM formando los complejos hexaméricos con ADN. Durante este trabajo se ha demostrado que la unión a ADN de la forma monomérica de BcMCM no depende de ATP. La mutación en el residuo Lisina del motivo Walker A (K653A) anula la capacidad de unión a ATP y con ello, la capacidad de hexamerizar. La forma monomérica de K653A hace que BcMCM sea inactiva. Sin embargo, este mutante interacciona con el ADN al igual que la proteína silvestre. El hecho de que el complejo hexamérico sea la forma activa de BcMCM, y que el monómero BcMCM sea capaz de unir ADN, genera la cuestión de la secuencia de acción durante el mecanismo de desenrollamiento del ADN por BcMCM: ¿En qué momento se da el ensamblaje de BcMCM en el ADN?, ¿Se da inicialmente la unión al ADN y luego la hexamerización?, o ¿ocurre en primer lugar la hexamerización y posteriormente la unión del complejo al ADN?

La forma de anillo cerrado de las helicasas replicativas condiciona el modelo de su ensamblaje sobre el ADN en la replicación. El ADN genómico *in vivo* no posee un extremo 3' o 5' libre. Esto dificulta el paso del ADN por el canal central de las helicasas. Para resolver esta incógnita se han planteado varias hipótesis, una de ellas plantea la necesidad de una proteína ("cargador") que facilite el ensamblaje de las helicasas en los orígenes de replicación (Davey & O'Donnell, 2003). Para ello, el cargador podría actuar de distintas maneras: como destructor, como disociador o bien como inductor del anillo helicasa sobre el ADN (Sakakibara et al, 2009a). Para las MCM de arqueas se han propuesto varios mecanismos posibles, donde la proteína Cdc6 actuaría como "cargador" (Sakakibara et al, 2009a), pero por el momento se desconoce el mecanismo real, pudiendo ser diferente dependiendo de la especie de arquea. Por otro parte, el mecanismo de ensamblaje propuesto para la helicasa de SV40 no necesita de un cargador, sino de ATP. La proteína LTag pertenece a la familia AAA+ ATPasa (Koonin, 1993), y a partir de su forma monomérica hexameriza en presencia de ATP y Mg²⁺ (Gai et al, 2004). Sin embargo, en presencia de ADN LTag forma doble hexámero sobre la molécula de ADN, partiendo de la forma monomérica (Dean et al, 1992).

El ensayo de retardo en la movilidad electroforética, en presencia de ssADN marcado, mostró una banda identificada como la interacción BcMCM monómero-ssADN. Tras la



incubación con ATPγS, además de la banda inicial, se detectó otra banda más retardada, posiblemente correspondiente a la interacción del complejo BcMCM hexamérico-ssADN. La banda del monómero disminuyó su intensidad tras la aparición de la banda superior, indicando que parte de los monómeros unidos a ssADN eran componentes de esta interacción de mayor envergadura. Este resultado plantea la posibilidad de que BcMCM funcione utilizando un mecanismo similar al propuesto para el virus SV40 (Davey & O'Donnell, 2003; Dean et al, 1992), donde los monómeros BcMCM se unirían al ADN, y en presencia de ATP, crearían el complejo hexamérico sobre la molécula de ácido nucleico (Figura 5.3). Por otro lado, la hipótesis de la formación de hexámero y la posterior unión del complejo al ADN, no está apoyada por el hecho de que el complejo BcMCM-ATPγS es inestable *in vitro*. Se ha demostrado la disociación del complejo tras la incubación en presencia de un tampón carente de ATPγS. El complejo hexamérico BcMCM, en ausencia de ADN, se disocia durante una cromatografía de filtración en gel, en ausencia de nucleótido en la fase móvil. Una situación similar se da durante una electroforesis en un gel nativo con un tampón de electroforesis sin nucleótido.

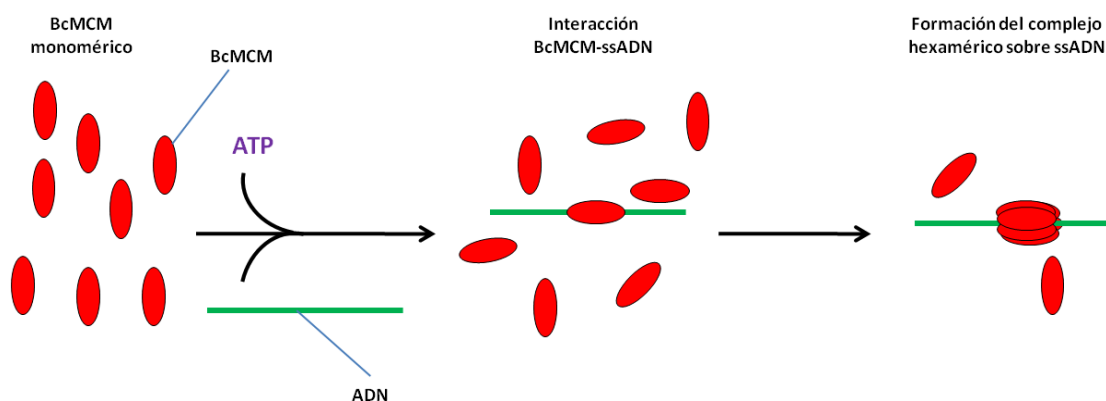


Figura 5.3. Esquema de un hipotético modelo de ensamblaje de BcMCM sobre el ADN. Los monómeros de BcMCM unen al ADN, y tras la estimulación por la asociación al ATP, se forma el complejo hexamérico sobre el ADN.

En ensayos de hexamerización de BcMCM, con el ssADN circular del bacteriófago M13 y ATPγS, se observó una disposición en cadena de los complejos BcMCM, que posiblemente se deba a la unión de los complejos al ADN circular (Figura 5.4). Al incubar el complejo con concentraciones de 300 mM NaCl no se pudieron detectar hexámeros en las micrografías del complejo sin ADN ssM13. Por el contrario, se pudieron observar varias moléculas de hexámeros de BcMCM, posiblemente cargadas en el ssADN de M13, a esa concentración de NaCl. Estas observaciones indican que la unión al ssM13 circular confiere una mayor estabilidad a los complejos hexaméricos. BcMCM se puede unir sin la ayuda de ningún cofactor

a la sonda de ADN circular, lo que implica que el anillo debe de abrirse o disociarse y ensamblarse sobre el ADN.

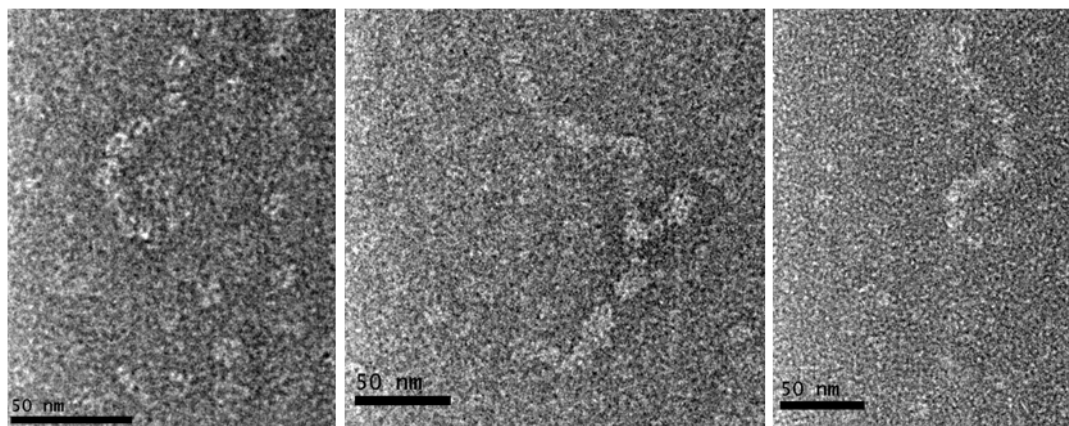


Figura 5.4. Campo de microscopía electrónica de los complejos BcMCM-ssM13. Imágenes que muestran la disposición en cadena de los complejos BcMCM formados sobre el ssADN circular de M13.

5.3. Mecanismo de acción de BcMCM en la replicación

5.3.1. CMG como helicasa replicativa

Recientemente, se ha propuesto el supracomplejo CMG como helicasa replicativa en eucariotas. Este complejo está compuesto por Cdc45, Mcm2-7 y GINS (Aparicio et al, 2006; Kubota et al, 2003). Los tres elementos que forman el complejo CMG se localizan en los sitios donde el ADN está siendo desenrollando en el complejo de progresión del replisoma (RPC) (Gambus et al, 2006). Cdc45 y GINS actuarían como cofactores para la activación del complejo Mcm2-7. Se cree que esta activación es una consecuencia del cambio alostérico en el complejo Mcm 2-7, creado por la asociación de Cdc45 y GINS, y que este cambio ayuda a la correcta coordinación de las seis subunidades del complejo Mcm2-7 (Ilves et al, 2010).

El complejo Mcm2-7 forma un doble hexámero sobre dsADN, que junto con el complejo ORC, Cdc6 y Cdt1 forma parte del complejo pre-Replicativo (Evrin et al, 2009; Remus et al, 2009). Sin embargo, Mcm2-7 antes del ensamblaje en el complejo pre-RC forma hexámeros simples (Evrin et al, 2009). El hecho de encontrarlo como doble hexámero en el origen de replicación no está de acuerdo con lo observado en el complejo CMG, donde Mcm2-7 es un hexámero simple (Moyer et al, 2006). La hipótesis actual es que Mcm2-7 se ensamble como un complejo doble hexamérico en el origen de replicación, y que una vez activado, los dos hexámeros de Mmc2-7 se desplacen en direcciones opuestas formando las dos horquillas



replicativas (Evrin et al, 2009; Yardimci et al, 2010). El doble hexámero de Mcm2-7 interacciona y se desplaza sobre dsADN, de manera independiente de ATP, en la fase G1 del ciclo celular (Laskey & Madine, 2003). Sin embargo, no se ha detectado el desplazamiento del complejo CMG sobre dsADN (Ilves et al, 2010). Se ha hipotetizado que la asociación de Cdc45 y GINS rompería el complejo doble hexamérico de Mcm2-7, generando un hexámero simple. La unión de estos cofactores parece crear un estrechamiento del canal central de Mcm2-7 y activaría el desenrollamiento de dsADN (Ilves et al, 2010). La propuesta de CMG como helicasa replicativa cambia la manera de visualizar el mecanismo de esta actividad. Los mecanismos principales propuestos hasta la fecha para la actividad helicasa del complejo Mcm2-7 en eucariotas son de dos tipos (Takahashi et al, 2005):

A.- Los basadas en la exclusión estérica (Kaplan et al, 2003; Laskey & Madine, 2003). Según este modelo, la helicasa une en su cavidad central una ssADN y se mueve sobre ella, desplazando a la complementaria por exclusión (Hacker & Johnson, 1997). Este modelo en el caso de Mcm2-7, supondría una reorganización interna del complejo por acción de CDK y DDK, para rodear ssADN durante la separación en vez de dsADN.

B.- El mecanismo basado en la bomba rotatoria es el propuesto para la helicasa LTag de SV40 (Li et al, 2003), y MthMCM (Pape et al, 2003). Según este modelo, múltiples helicasas se unen a la doble cadena de ADN y se mueven sobre ella hasta que alcanzan una estructura nuclear donde anclarse. Actúan como bombas rotatorias, rotando el dsADN situado entre dos helicasas en direcciones opuestas y desenrollando como consecuencia el ADN.

El problema de estos dos modelos es el rol propuesto para el complejo Mcm2-7 como único responsable del desenrollamiento del ADN. Sin embargo, una modificación del modelo de bomba rotatoria podría adecuarse a la nueva situación generada por el hallazgo del complejo CMG. Así, el complejo Mcm 2-7 actuaría como una translocasa de dsADN (Laskey & Madine, 2003), mientras que GINS y Cdc45 intervendrían de manera directa en el desenrollamiento del ADN, actuando como un “arado” durante el bombeo y separación del ADN (Boskovic et al, 2007; Remus et al, 2009; Takahashi et al, 2005). Este modelo de arado permitiría la actuación de la helicasa replicativa a cierta distancia de la síntesis de ADN (Laskey & Madine, 2003; Mendez & Stillman, 2003) y explicaría “la paradoja de las MCM” (Hyrien et al, 2003), la cual pone en evidencia que *foci* detectados por inmunofluorescencia del complejo Mcm2-7 no se colocan con los formados por la maquinaria de síntesis de ADN, en contraste con PCNA. Dado su papel propuesto de helicasa replicativa en eucariotas, el complejo Mcm2-7 debería localizarse junto a la horquilla replicativa (Dimitrova et al, 1999). Además, hay un



exceso de MCM asociadas con la cromatina con respecto al número teórico de horquillas de replicación. Este exceso se ha considerado importante para el mantenimiento de la integridad genómica en situaciones de estrés replicativo (Ibarra et al, 2008).

5.3.2. BcMCM en la replicación

La proteína BcMCM separa la doble cadena de ADN con polaridad 3'-5', en un proceso dependiente de ATP (Samuels et al, 2009), igual que las MCM de arqueas y eucariotas. El volumen 3D de BcMCM muestra un anillo hexamérico con una cavidad central de aproximadamente 25 Å en presencia de ADN. Estas dimensiones son suficientes para acomodar dsADN. BcMCM interacciona tanto con ssADN como con dsADN, siendo mayor la afinidad por ssADN. Esta preferencia por la cadena sencilla de ADN o estructuras que contienen ssADN se ha observado en el complejo Mcm2-7 (Bochman & Schwacha, 2007) y SsoMCM (Pucci et al, 2004, Rothenberg et al, 2007). Además de la cavidad central, la estructura en forma de barril de BcMCM muestra seis canales laterales entre las subunidades con un diámetro adecuado para un posible paso de ssADN. Esta disposición del canal central y los seis canales laterales recuerda a la observada en MthMCM (Gomez-Llorente et al, 2005; Pape et al, 2003), en SsoMCM (Brewster et al, 2008; Costa et al, 2006a), en la helicasa LTag de SV40 (Li et al, 2003) y en el complejo doble hexamérico de Mcm2-7 (Remus et al, 2009). En todas ellas, se ha propuesto la expulsión de ssADN por los canales laterales, dada la carga positiva en esa región (Brewster & Chen, 2010; Brewster et al, 2010; Brewster et al, 2008; Li et al, 2003). Las horquillas β , relacionadas con la unión al ADN y actividad helicasa, se sitúan en la cavidad central y canales lateral del hexámero SsoMCM (Brewster & Chen, 2010; Brewster et al, 2010). El alineamiento realizado de BcMCM con las MCM de arqueas y eucariotas (Resultados Figura 4.6) no muestra una conservación total de estas horquillas β , sin embargo, los residuos Lisina K323 y Arginina R331 de EXT-hp ("external β hairpin") y la lisina K430 de PS-1-hp ("pre-sensor 1 β hairpin") de SsoMCM están conservados (Brewster et al, 2010; McGeoch et al, 2005). En el mecanismo de acción de LTag y SsoMCM, se ha propuesto una orientación en la cual el ADN se traslada desde el domino AAA+ hacia la parte N-terminal de las proteínas (Li et al, 2003; McGeoch et al, 2005). Debido a las similitudes estructurales y funcionales, el mecanismo de acción de BcMCM será parecido a los propuestos para los ortólogos de MCM en arqueas y la helicasa LTag de SV40.

En base a estos datos, se puede hipotetizar sobre tres posibles modelos: un primer modelo de exclusión estérica (Hacker & Johnson, 1997), en el que solo una de las dos hebras



de ADN atravesaría la cavidad central del complejo BcMCM. La hebra complementaria en cambio, la discontinua, se vería desplazada y excluida hacia la parte externa del complejo (Figura 5.5A), como se ha descrito para la primasa-helicasa T7 (Hacker & Johnson, 1997; Toth et al, 2003). Los otros dos posibles modelos son similares entre sí. En ambos casos el dsADN se introduciría por el dominio helicasa, y una vez desenrollada la doble cadena de ADN, la cadena discontinua sería expulsada por los canales laterales. La diferencia entre ambos modelos reside en el comportamiento de la cadena continua. En el modelo B, la cadena continua atravesaría la cavidad central (Figura 5.5B), como se ha propuesto para la arquea SsoMCM (Brewster & Chen, 2008, Brewster et al, 2010), mientras que en el modelo C, sería expulsada por otro de los canales laterales del complejo hexamérico (Figura 5.5C). Este último modelo fue propuesta para las MCM helicases (Brewster & Chen, 2010; Sakakibara et al, 2009b).

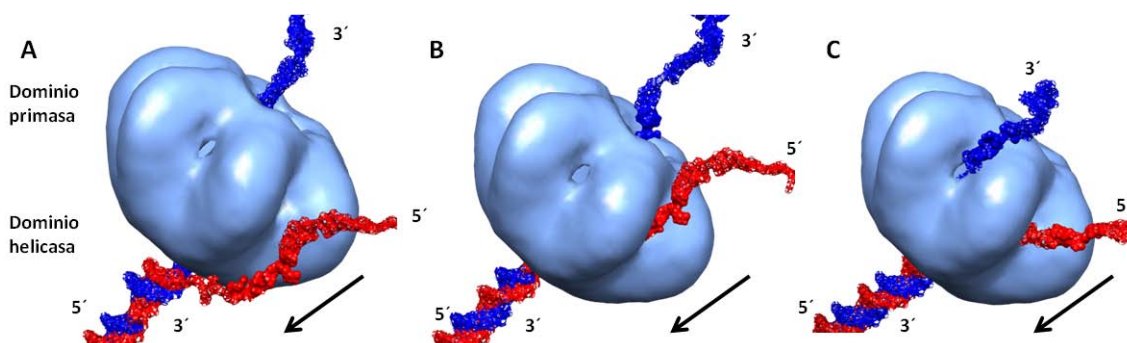


Figura 5.5. Modelos propuestos para el mecanismo de la actividad helicasa de BcMCM. Se proponen tres posibles modelos en los que el ADN se desplaza desde el dominio helicasa al dominio primasa. **A.** Modelo de exclusión estérica. BcMCM se movería sobre la hebra continua y desplazaría la hebra discontinua por la parte externa del complejo. En los otros dos modelos B y C el dsADN entraría por la parte del dominio helicasa en la cavidad central y desenrollaría el ADN, expulsando las hebras separadamente. En el modelo **B**, la hebra discontinua sería expulsada por uno de los canales laterales y la continua por la cavidad central. En el modelo **C**, ambas hebras serían expulsadas por dos de los seis canales laterales del complejo BcMCM. El volumen 3D utilizado en los modelos corresponde al complejo BcMCM-ATPγS-ADN. La hebra de ADN continua se muestra en azul y la discontinua en rojo. La flecha indica la dirección del movimiento de BcMCM.

5.3.3. Síntesis de ADN en la replicación

La replicación del ADN está mediada por complejos de proteínas que se ensamblan en la horquilla de replicación y dirigen la síntesis coordinada de las dos hebras de ADN. En organismos simples, como el bacteriófago T7, son cuatro los factores necesarios para la replicación del genoma: la ADN polimerasa (gen 5), el factor de procesividad de la polimerasa Tio redoxina ("Thioredoxin") de *E. coli*, la proteína de unión a ssADN (gen 2.5) y por último la proteína primasa-helicasa T7 (gen 4) (Kato et al, 2001). En cambio, en sistemas más complejos

como eucariotas o el virus SV40, se necesitan más componentes para realizar la duplicación del genoma con una extrema fiabilidad. En este caso, son indispensables, además de una helicasa para la separación de las hebras de la doble hélice de ADN (LTag en el caso de SV40 y el complejo CMG para las eucariotas), un complejo polimerasa α /primasa, el factor de procesividad de la polimerasa (PCNA), las polimerasas δ y ϵ (no en SV40 (Zlotkin et al, 1996)), la proteína de unión a ssADN denominada RPA , la topoisomerasa y el factor de replicación C (RFC) (Chagin et al, 2010; Waga & Stillman, 1998). La acción de estas proteínas permite la correcta coordinación de la síntesis de ADN en las hebras continua y discontinua. La mayoría de los descubrimientos sobre la horquilla replicativa de eucariotas provienen de estudios realizados con los extractos de las células mamíferas infectadas por el virus SV40.

5.3.3.1. BcMCM en la horquilla replicativa.

El gen BcMCM (BC1863), integrado en el genoma de *B. cereus*, se encuentra localizado en una unidad policistónica de transcripción inmediatamente anterior al gen de la polimerasa del fago phBC6A51 (McGeoch & Bell, 2005). Los bacteriófagos son virus que infectan a bacterias integrando su información genética en el genoma del huésped. La maquinaria replicativa del fago phBC6A51 aprovecha la maquinaria bacteriana. La proteína BcMCM, al combinar una helicasa y una primasa, simplifica la maquinaria necesaria para la síntesis de ADN. Por una parte, guarda similitudes con la maquinaria replicativa de arqueas y eucariotas por poseer un dominio AAA+ y un dominio primasa homólogo a la ADN primasa arquea y eucariota (McGeoch & Bell, 2005). Pero a la vez, el gen que codifica BcMCM está integrado en una bacteria y su naturaleza recuerda a la primasa-helicasa del bacteriófago T7.

En este trabajo se ha estudiado la relación estructura-función de BcMCM. La formación del complejo BcMCM hexamérico es una condición *sine qua non* para su función como helicasa replicativa. Sin embargo, el hexámero no es necesario para la síntesis de cebadores de ARN. A diferencia de los bacteriófagos y bacterias, BcMCM posee una actividad helicasa con polaridad 3'-5' dependiente de ATP (Samuels et al, 2009). La hidrólisis de ATP estimulada por la presencia de ADN (Samuels et al, 2009) proporciona la energía necesaria para separar las dos hebras de ADN en la horquilla replicativa. Para la síntesis de ADN, los factores necesarios serían mínimos, recreando un escenario similar al de la helicasa T7 (Kato et al, 2001): BcMCM, la polimerasa del fago, un factor de procesividad que estimule a la polimerasa y proteínas de unión a ssADN.



En la síntesis de ADN, BcMCM separa las dos hebras de ADN en dirección 3'-5'. Los modelos propuestos anteriormente para la acción helicasa de BcMCM condicionarían la actuación de la primasa. En el primer modelo propuesto (Figura 5.5A y Figura 5.6A), la hebra discontinua se vería desplazada hacia la parte externa del complejo, de manera que contactaría con la parte primasa de BcMCM por fuera, tal y como se ha propuesto para la primasa-helicasa T7 (Toth et al, 2003; VanLoock et al, 2001). Sin embargo, en los otros dos modelos, la hebra discontinua sería expulsada por uno de los canales laterales que posee el complejo hexamérico (Figura 5.5B y 5.5C) (Figura 5.6B y 5.6C). Por tanto, en este caso BcMCM sintetizaría los cebadores en la hebra discontinua, al inicio de cada fragmento de Okazaki, conforme sale la hebra por el canal lateral. El cebador inicial que la primasa de BcMCM sintetiza en la hebra continua sería polimerizado en el interior de la cavidad central para los dos primeros modelos helicasa (Figura 5.6A y 5.6B). Sin embargo, para el modelo C, la primasa actuaría en la hebra continua de la misma manera que en la discontinua, sintetizando el cebador conforme pasa por el canal lateral (Figura 5.6C). El cambio conformacional observado al unir ADN en el complejo, refleja la flexión y movimiento de las subunidades hacia la cavidad central, posibilitando el contacto del dominio primasa y helicasa con el ADN. Puede que el "linker" que separa la primasa y helicasa proporcione cierta flexibilidad a ambos dominios, igual que en la primasa-helicasa T7 (Toth et al, 2003). La primasa es activa en la forma monomérica, por lo que no necesita de la interacción de las otras cinco primasas para sintetizar el cebador. Se podría pensar en un mecanismo primasa similar al propuesto para la primasa-helicasa T7 (Hamdan & Richardson, 2009), donde en la primera mitad C-terminal la helicasa desenrolla el ADN, mientras que la primasa en la parte posterior interacciona con las hebras de ADN separadas y sintetiza los cebadores. La ADN polimerasa tras ser estimulada por el factor de procesividad sintetizaría el ADN de la cadena continua y los fragmento de Okazaki a partir de los cebadores (Figura 5.6), como lo hace la Tioredoxina de *E. coli* en el bacteriófago T7 (Yang & Richardson, 1997). En el virus SV40 el proceso de estimulación de las polimerasas y su actividad resulta más complejo. Una vez que el complejo polimerasa α /primasa sintetiza el fragmento ARN-ADN, el factor RFC se une al extremo 3' del cebador en un proceso dependiente de ATP (Waga & Stillman, 1994). La unión de RFC conlleva la disociación de la polimerasa α /primasa y el ensamblaje del factor de procesividad PCNA y polimerasa δ (Waga & Stillman, 1994), que sintetizará las nuevas hebras de ADN. La proteína de unión a ssADN recubriría las hebras separadas de ADN, para evitar la formación de estructuras secundarias, comportándose de manera similar al del bacteriófago T7 (Kim et al, 1992) y al RPA de las eucariotas (Borowiec et al, 1990).

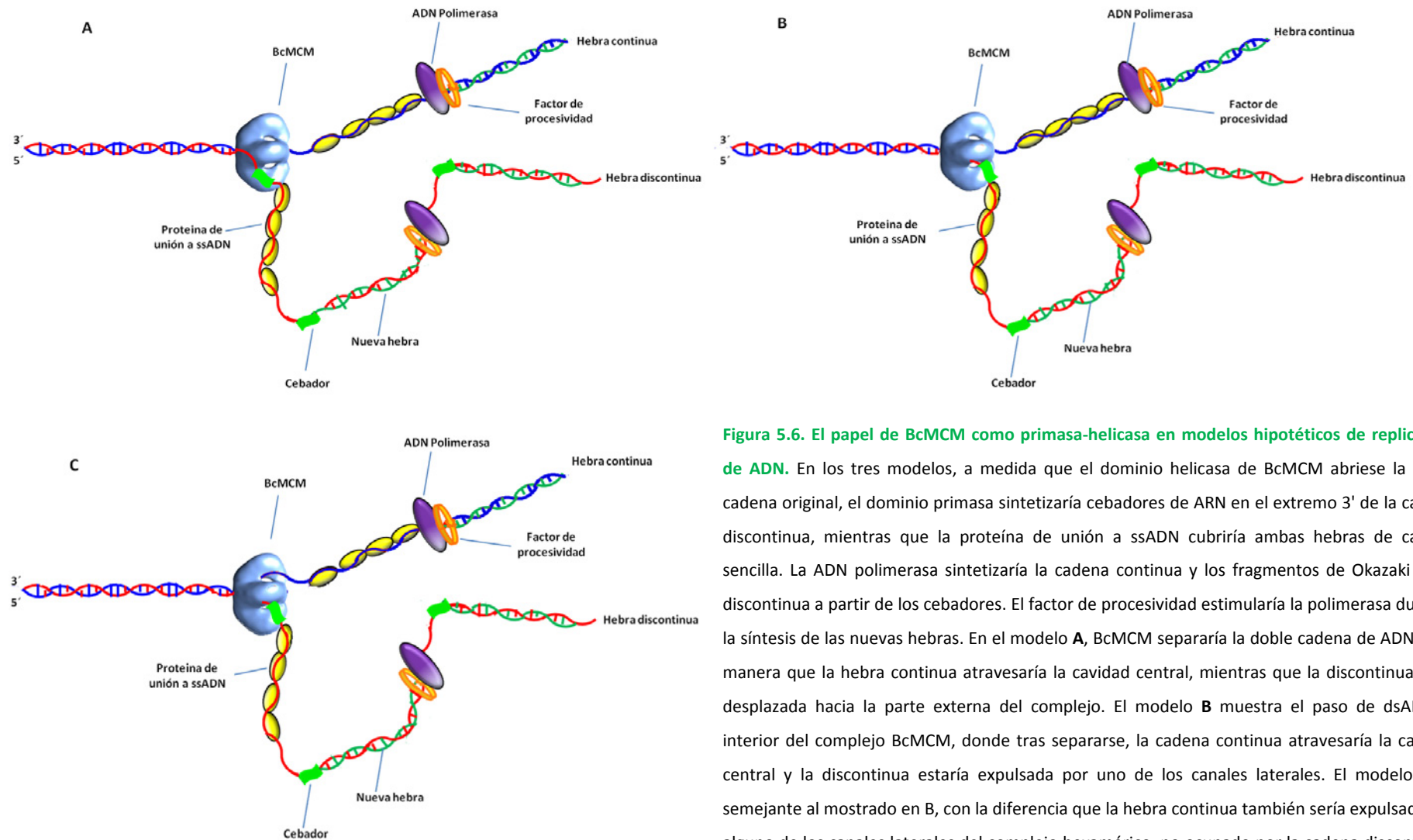
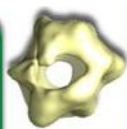
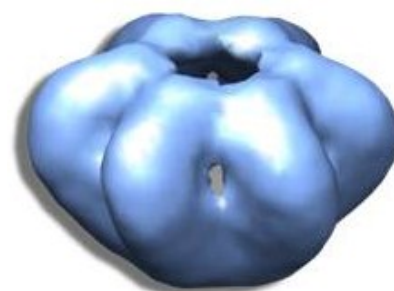


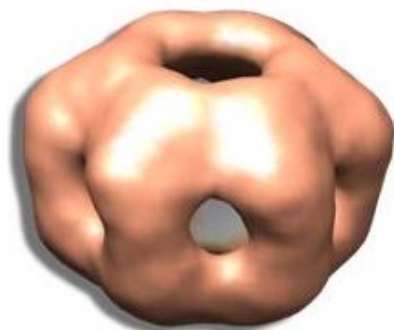
Figura 5.6. El papel de BcMCM como primasa-helicasa en modelos hipotéticos de replicación de ADN.

En los tres modelos, a medida que el dominio helicasa de BcMCM abriese la doble cadena original, el dominio primasa sintetizaría cebadores de ARN en el extremo 3' de la cadena discontinua, mientras que la proteína de unión a ssADN cubriría ambas hebras de cadena sencilla. La ADN polimerasa sintetizaría la cadena continua y los fragmentos de Okazaki de la discontinua a partir de los cebadores. El factor de procesividad estimularía la polimerasa durante la síntesis de las nuevas hebras. En el modelo **A**, BcMCM separaría la doble cadena de ADN de la manera que la hebra continua atravesaría la cavidad central, mientras que la discontinua sería desplazada hacia la parte externa del complejo. El modelo **B** muestra el paso de dsADN al interior del complejo BcMCM, donde tras separarse, la cadena continua atravesaría la cavidad central y la discontinua estaría expulsada por uno de los canales laterales. El modelo **C** es semejante al mostrado en B, con la diferencia que la hebra continua también sería expulsada por alguno de los canales laterales del complejo hexamérico, no ocupado por la cadena discontinua. Se indican los nombres de cada componente de la horquilla replicativa.



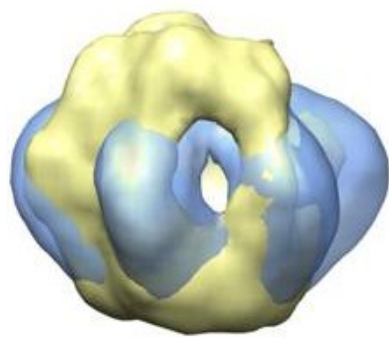


6. Conclusiones



Conclusiones

1. BcMCM y sus mutantes del centro activo, expresados en *E. coli*, se purifican en su forma monomérica.
2. ssADN estimula la hidrólisis de ATP de la proteína BcMCM. Las mutaciones puntuales del centro catalítico disminuyen la actividad ATPasa de BcMCM, anulándola en el caso de la mutación en el motivo Walker A.
3. El monómero de BcMCM interacciona con ssADN y dsADN, siendo mayor la afinidad por ssADN.
4. La proteína BcMCM separa las dos hebras de dsADN con polaridad 3'-5' en un proceso dependiente de hidrólisis de ATP y aniones específicos. BcMCM tiene actividad helicasa como homohexámero.
5. BcMCM forma complejos hexaméricos tras la unión de los nucleótidos ATP, ATPγS o ADP. Los complejos se forman con o sin ADN, siendo más estables los formados con ADN.
6. La forma monomérica de BcMCM es capaz de sintetizar pequeños fragmentos de ARN en presencia de ribonucleótidos y un ssADN molde. Sin embargo, el dominio primasa, BcMCM¹⁻³⁶¹, no muestra ni actividad primasa ni interacción con ssADN.
7. La reconstrucción tridimensional a baja resolución, obtenida por microscopía electrónica, del complejo BcMCM-ATPγS muestra una estructura con simetría seis en forma de barril, con una cavidad central y seis canales laterales. La parte superior e inferior de la estructura son asimétricas, siendo el diámetro de la cavidad central mayor en la parte superior que en la parte inferior. El complejo BcMCM-ATPγS cambia su conformación tras la unión de ADN.
8. El dominio helicasa, BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹, forma complejos hexaméricos mientras que el dominio primasa, BcMCM¹⁻³⁶¹, posiblemente se mantiene como monómero en solución.
9. El dominio BcMCM⁵⁰¹⁻¹⁰²⁹ muestra una menor actividad ATPasa y helicasa que la proteína BcMCM completa.
10. Se han propuesto posibles modelos de acción de BcMCM en la replicación de ADN, en base a los resultados funcionales y estructurales obtenidos durante el trabajo de tesis y las similitudes con complejos de otras especies descritas en la literatura.



7. Bibliografía

Adachi Y, Usukura J, Yanagida M (1997) A globular complex formation by Nda1 and the other five members of the MCM protein family in fission yeast. *Genes Cells* **2**: 467-479

Aparicio T, Ibarra A, Mendez J (2006) Cdc45-MCM-GINS, a new power player for DNA replication. *Cell Div* **1**: 18

Bae B, Chen YH, Costa A, Onesti S, Brunzelle JS, Lin Y, Cann IK, Nair SK (2009) Insights into the architecture of the replicative helicase from the structure of an archaeal MCM homolog. *Structure* **17**: 211-222

Bailey S, Eliason WK, Steitz TA (2007a) The crystal structure of the *Thermus aquaticus* DnaB helicase monomer. *Nucleic Acids Res* **35**: 4728-4736

Bailey S, Eliason WK, Steitz TA (2007b) Structure of hexameric DnaB helicase and its complex with a domain of DnaG primase. *Science* **318**: 459-463

Barry ER, McGeoch AT, Kelman Z, Bell SD (2007) Archaeal MCM has separable processivity, substrate choice and helicase domains. *Nucleic Acids Res* **35**: 988-998

Bell SP, Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374

Bhattacharyya S, Griep MA (2000) DnaB helicase affects the initiation specificity of *Escherichia coli* primase on single-stranded DNA templates. *Biochemistry* **39**: 745-752

Bird LE, Pan H, Soultanas P, Wigley DB (2000) Mapping protein-protein interactions within a stable complex of DNA primase and DnaB helicase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry* **39**: 171-182

Bochman ML, Bell SP, Schwacha A (2008) Subunit organization of Mcm2-7 and the unequal role of active sites in ATP hydrolysis and viability. *Mol Cell Biol* **28**: 5865-5873

Bochman ML, Schwacha A The *Saccharomyces cerevisiae* Mcm6/2 and Mcm5/3 ATPase active sites contribute to the function of the putative Mcm2-7 'gate'. *Nucleic Acids Res*

Bochman ML, Schwacha A (2007) Differences in the single-stranded DNA binding activities of MCM2-7 and MCM467: MCM2 and MCM5 define a slow ATP-dependent step. *J Biol Chem* **282**: 33795-33804

Bochman ML, Schwacha A (2008) The Mcm2-7 complex has in vitro helicase activity. *Mol Cell* **31**: 287-293



Bochman ML, Schwacha A (2009) The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 652-683

Borowiec JA, Dean FB, Bullock PA, Hurwitz J (1990) Binding and unwinding--how T antigen engages the SV40 origin of DNA replication. *Cell* **60**: 181-184

Boskovic J, Coloma J, Aparicio T, Zhou M, Robinson CV, Mendez J, Montoya G (2007) Molecular architecture of the human GINS complex. *EMBO Rep* **8**: 678-684

Bowers JL, Randell JC, Chen S, Bell SP (2004) ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. *Mol Cell* **16**: 967-978

Brewster AS, Chen XS (2010) Insights into the MCM functional mechanism: lessons learned from the archaeal MCM complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**: 243-256

Brewster AS, Slaymaker IM, Afif SA, Chen XS (2010) Mutational analysis of an archaeal minichromosome maintenance protein exterior hairpin reveals critical residues for helicase activity and DNA binding. *BMC Mol Biol* **11**: 62

Brewster AS, Wang G, Yu X, Greenleaf WB, Carazo JM, Tjajadia M, Klein MG, Chen XS (2008) Crystal structure of a near-full-length archaeal MCM: functional insights for an AAA+ hexameric helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 20191-20196

Collins KL, Kelly TJ (1991) Effects of T antigen and replication protein A on the initiation of DNA synthesis by DNA polymerase alpha-primase. *Mol Cell Biol* **11**: 2108-2115

Collins KL, Russo AA, Tseng BY, Kelly TJ (1993) The role of the 70 kDa subunit of human DNA polymerase alpha in DNA replication. *EMBO J* **12**: 4555-4566

Corn JE, Berger JM (2006) Regulation of bacterial priming and daughter strand synthesis through helicase-primase interactions. *Nucleic Acids Res* **34**: 4082-4088

Costa A, Onesti S (2009) Structural biology of MCM helicases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**: 326-342

Costa A, Pape T, van Heel M, Brick P, Patwardhan A, Onesti S (2006a) Structural basis of the Methanothermobacter thermautotrophicus MCM helicase activity. *Nucleic Acids Res* **34**: 5829-5838

Costa A, Pape T, van Heel M, Brick P, Patwardhan A, Onesti S (2006b) Structural studies of the archaeal MCM complex in different functional states. *J Struct Biol* **156**: 210-219



Costa A, van Duinen G, Medagli B, Chong J, Sakakibara N, Kelman Z, Nair SK, Patwardhan A, Onesti S (2008) Cryo-electron microscopy reveals a novel DNA-binding site on the MCM helicase. *EMBO J* **27**: 2250-2258

Chagin VO, Stear JH, Cardoso MC Organization of DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000737

Chen YJ, Yu X, Kasiviswanathan R, Shin JH, Kelman Z, Egelman EH (2005) Structural polymorphism of *Methanothermobacter thermautotrophicus* MCM. *J Mol Biol* **346**: 389-394

Chong JP, Hayashi MK, Simon MN, Xu RM, Stillman B (2000) A double-hexamer archaeal minichromosome maintenance protein is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1530-1535

Davey MJ, Indiani C, O'Donnell M (2003) Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture. *J Biol Chem* **278**: 4491-4499

Davey MJ, O'Donnell M (2003) Replicative helicase loaders: ring breakers and ring makers. *Curr Biol* **13**: R594-596

Dean FB, Borowiec JA, Eki T, Hurwitz J (1992) The simian virus 40 T antigen double hexamer assembles around the DNA at the replication origin. *J Biol Chem* **267**: 14129-14137

DePamphilis ML, Blow JJ, Ghosh S, Saha T, Noguchi K, Vassilev A (2006) Regulating the licensing of DNA replication origins in metazoa. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 231-239

Dimitrova DS, Todorov IT, Melendy T, Gilbert DM (1999) Mcm2, but not RPA, is a component of the mammalian early G1-phase prereplication complex. *J Cell Biol* **146**: 709-722

Dornreiter I, Copeland WC, Wang TS (1993) Initiation of simian virus 40 DNA replication requires the interaction of a specific domain of human DNA polymerase alpha with large T antigen. *Mol Cell Biol* **13**: 809-820

Dornreiter I, Hoss A, Arthur AK, Fanning E (1990) SV40 T antigen binds directly to the large subunit of purified DNA polymerase alpha. *EMBO J* **9**: 3329-3336

Erzberger JP, Berger JM (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**: 93-114

Evrin C, Clarke P, Zech J, Lurz R, Sun J, Uhle S, Li H, Stillman B, Speck C (2009) A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 20240-20245



Fletcher RJ, Bishop BE, Leon RP, Sclafani RA, Ogata CM, Chen XS (2003) The structure and function of MCM from archaeal *M. Thermoautotrophicum*. *Nat Struct Biol* **10**: 160-167

Forsburg SL (2004) Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 109-131

Forterre P (1999) Displacement of cellular proteins by functional analogues from plasmids or viruses could explain puzzling phylogenies of many DNA informational proteins. *Mol Microbiol* **33**: 457-465

Frick DN, Baradaran K, Richardson CC (1998) An N-terminal fragment of the gene 4 helicase/primase of bacteriophage T7 retains primase activity in the absence of helicase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7957-7962

Frick DN, Richardson CC (1999) Interaction of bacteriophage T7 gene 4 primase with its template recognition site. *J Biol Chem* **274**: 35889-35898

Frick DN, Richardson CC (2001) DNA primases. *Annu Rev Biochem* **70**: 39-80

Gai D, Li D, Finkelstein CV, Ott RD, Taneja P, Fanning E, Chen XS (2004) Insights into the oligomeric states, conformational changes, and helicase activities of SV40 large tumor antigen. *J Biol Chem* **279**: 38952-38959

Gambus A, Jones RC, Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, van Deursen F, Edmondson RD, Labib K (2006) GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* **8**: 358-366

Garg P, Burgers PM (2005) DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**: 115-128

Gomez-Llorente Y, Fletcher RJ, Chen XS, Carazo JM, San Martin C (2005) Polymorphism and double hexamer structure in the archaeal minichromosome maintenance (MCM) helicase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Biol Chem* **280**: 40909-40915

Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metoz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305-308

Grabowski B, Kelman Z (2003) Archeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context. *Annu Rev Microbiol* **57**: 487-516

Guo S, Tabor S, Richardson CC (1999) The linker region between the helicase and primase domains of the bacteriophage T7 gene 4 protein is critical for hexamer formation. *J Biol Chem* **274**: 30303-30309



Hacker KJ, Johnson KA (1997) A hexameric helicase encircles one DNA strand and excludes the other during DNA unwinding. *Biochemistry* **36**: 14080-14087

Hamdan SM, Richardson CC (2009) Motors, switches, and contacts in the replisome. *Annu Rev Biochem* **78**: 205-243

Hanson PI, Whiteheart SW (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 519-529

Hellman LM, Fried MG (2007) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* **2**: 1849-1861

Hingorani MM, Patel SS (1996) Cooperative interactions of nucleotide ligands are linked to oligomerization and DNA binding in bacteriophage T7 gene 4 helicases. *Biochemistry* **35**: 2218-2228

Hubscher U, Maga G, Spadari S (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **71**: 133-163

Hyrien O, Marheineke K, Goldar A (2003) Paradoxes of eukaryotic DNA replication: MCM proteins and the random completion problem. *Bioessays* **25**: 116-125

Ibarra A, Schwob E, Mendez J (2008) Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 8956-8961

Ilves I, Petojevic T, Pesavento JJ, Botchan MR Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell* **37**: 247-258

Iost I, Dreyfus M, Linder P (1999) Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *J Biol Chem* **274**: 17677-17683

Ishimi Y (1997) A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem* **272**: 24508-24513

Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, Bhattacharyya A, Reznik G, Mikhailova N, Lapidus A, Chu L, Mazur M, Goltsman E, Larsen N, D'Souza M, Walunas T, Grechkin Y, Pusch G, Haselkorn R, Fonstein M, Ehrlich SD, Overbeek R, Kyrpides N (2003) Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**: 87-91



Iyer LM, Koonin EV, Leipe DD, Aravind L (2005) Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members. *Nucleic Acids Res* **33**: 3875-3896

Jenkinson ER, Chong JP (2006) Minichromosome maintenance helicase activity is controlled by N- and C-terminal motifs and requires the ATPase domain helix-2 insert. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7613-7618

Jezewska MJ, Bujalowski W (1996) Global conformational transitions in Escherichia coli primary replicative helicase DnaB protein induced by ATP, ADP, and single-stranded DNA binding. Multiple conformational states of the helicase hexamer. *J Biol Chem* **271**: 4261-4265

Johansson E, Macneill SA The eukaryotic replicative DNA polymerases take shape. *Trends Biochem Sci* **35**: 339-347

Johnson SK, Bhattacharyya S, Griep MA (2000) DnaB helicase stimulates primer synthesis activity on short oligonucleotide templates. *Biochemistry* **39**: 736-744

Kaplan DL, Davey MJ, O'Donnell M (2003) Mcm4,6,7 uses a "pump in ring" mechanism to unwind DNA by steric exclusion and actively translocate along a duplex. *J Biol Chem* **278**: 49171-49182

Kato M, Frick DN, Lee J, Tabor S, Richardson CC, Ellenberger T (2001) A complex of the bacteriophage T7 primase-helicase and DNA polymerase directs primer utilization. *J Biol Chem* **276**: 21809-21820

Kearsey SE, Labib K (1998) MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim Biophys Acta* **1398**: 113-136

Kelman Z, Hurwitz J (2003) Structural lessons in DNA replication from the third domain of life. *Nat Struct Biol* **10**: 148-150

Kelman Z, White MF (2005) Archaeal DNA replication and repair. *Curr Opin Microbiol* **8**: 669-676

Kim YT, Tabor S, Bortner C, Griffith JD, Richardson CC (1992) Purification and characterization of the bacteriophage T7 gene 2.5 protein. A single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem* **267**: 15022-15031

Koonin EV (1993) A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Nucleic Acids Res* **21**: 2541-2547



Kubota Y, Takase Y, Komori Y, Hashimoto Y, Arata T, Kamimura Y, Araki H, Takisawa H (2003) A novel ring-like complex of *Xenopus* proteins essential for the initiation of DNA replication. *Genes Dev* **17**: 1141-1152

Kuchta RD, Stengel G (2010) Mechanism and evolution of DNA primases. *Biochim Biophys Acta* **1804**: 1180-1189

Kunkel TA, Burgers PM (2008) Dividing the workload at a eukaryotic replication fork. *Trends Cell Biol* **18**: 521-527

Labib K, Tercero JA, Diffley JF (2000) Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science* **288**: 1643-1647

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948

Laskey RA, Madine MA (2003) A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks. *EMBO Rep* **4**: 26-30

Lee JK, Hurwitz J (2001) Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 54-59

Lei M, Tye BK (2001) Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* **114**: 1447-1454

Li D, Zhao R, Lilyestrom W, Gai D, Zhang R, DeCaprio JA, Fanning E, Jochimiak A, Szakonyi G, Chen XS (2003) Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature* **423**: 512-518

Liu W, Pucci B, Rossi M, Pisani FM, Ladenstein R (2008) Structural analysis of the *Sulfolobus solfataricus* MCM protein N-terminal domain. *Nucleic Acids Res* **36**: 3235-3243

Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* **128**: 82-97

Llorca O (2005) Introduction to 3D reconstruction of macromolecules using single particle electron microscopy. *Acta Pharmacol Sin* **26**: 1153-1164



Ma X, Stead BE, Rezvanpour A, Davey MJ (2010) The effects of oligomerization on *Saccharomyces cerevisiae* Mcm4/6/7 function. *BMC Biochem* **11**: 37

MacNeill SA Structure and function of the GINS complex, a key component of the eukaryotic replisome. *Biochem J* **425**: 489-500

Machida YJ, Hamlin JL, Dutta A (2005) Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* **123**: 13-24

Maine GT, Sinha P, Tye BK (1984) Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics* **106**: 365-385

Marabini R, Masegosa IM, San Martin MC, Marco S, Fernandez JJ, de la Fraga LG, Vaquerizo C, Carazo JM (1996) Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy. *J Struct Biol* **116**: 237-240

Marinsek N, Barry ER, Makarova KS, Dionne I, Koonin EV, Bell SD (2006) GINS, a central nexus in the archaeal DNA replication fork. *EMBO Rep* **7**: 539-545

Mastrangelo IA, Hough PV, Wall JS, Dodson M, Dean FB, Hurwitz J (1989) ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication. *Nature* **338**: 658-662

McGeoch AT, Bell SD (2005) Eukaryotic/archaeal primase and MCM proteins encoded in a bacteriophage genome. *Cell* **120**: 167-168

McGeoch AT, Bell SD (2008) Extra-chromosomal elements and the evolution of cellular DNA replication machineries. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 569-574

McGeoch AT, Trakselis MA, Laskey RA, Bell SD (2005) Organization of the archaeal MCM complex on DNA and implications for the helicase mechanism. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 756-762

McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**: 404-405

Mendez J, Stillman B (2003) Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. *Bioessays* **25**: 1158-1167

Moreau MJ, McGeoch AT, Lowe AR, Itzhaki LS, Bell SD (2007) ATPase site architecture and helicase mechanism of an archaeal MCM. *Mol Cell* **28**: 304-314



Moyer SE, Lewis PW, Botchan MR (2006) Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10236-10241

Murakami Y, Eki T, Hurwitz J (1992) Studies on the initiation of simian virus 40 replication in vitro: RNA primer synthesis and its elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 952-956

Nakai H, Richardson CC (1988) Leading and lagging strand synthesis at the replication fork of bacteriophage T7. Distinct properties of T7 gene 4 protein as a helicase and primase. *J Biol Chem* **263**: 9818-9830

Pacek M, Tutter AV, Kubota Y, Takisawa H, Walter JC (2006) Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* **21**: 581-587

Pacek M, Walter JC (2004) A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *EMBO J* **23**: 3667-3676

Panuska JR, Goldthwait DA (1980) A DNA-dependent ATPase from T4-infected Escherichia coli. Purification and properties of a 63,000-dalton enzyme and its conversion to a 22,000-dalton form. *J Biol Chem* **255**: 5208-5214

Pape T, Meka H, Chen S, Vicentini G, van Heel M, Onesti S (2003) Hexameric ring structure of the full-length archaeal MCM protein complex. *EMBO Rep* **4**: 1079-1083

Patel SS, Picha KM (2000) Structure and function of hexameric helicases. *Annu Rev Biochem* **69**: 651-697

Plevani P, Foiani M, Muzi Falconi M, Pizzagalli A, Santocanale C, Francesconi S, Valsasnini P, Comedini A, Piatti S, Lucchini G (1988) The yeast DNA polymerase-primase complex: genes and proteins. *Biochim Biophys Acta* **951**: 268-273

Pucci B, De Felice M, Rossi M, Onesti S, Pisani FM (2004) Amino acids of the *Sulfolobus solfataricus* mini-chromosome maintenance-like DNA helicase involved in DNA binding/remodeling. *J Biol Chem* **279**: 49222-49228

Remus D, Beuron F, Tolun G, Griffith JD, Morris EP, Diffley JF (2009) Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell* **139**: 719-730

Remus D, Diffley JF (2009) Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 771-777



Rothenberg E, Trakselis MA, Bell SD, Ha T (2007) MCM forked substrate specificity involves dynamic interaction with the 5'-tail. *J Biol Chem* **282**: 34229-34234

Sakakibara N, Kelman LM, Kelman Z (2009a) How is the archaeal MCM helicase assembled at the origin? Possible mechanisms. *Biochem Soc Trans* **37**: 7-11

Sakakibara N, Kelman LM, Kelman Z (2009b) Unwinding the structure and function of the archaeal MCM helicase. *Mol Microbiol* **72**: 286-296

Samuels M, Gulati G, Shin JH, Opara R, McSweeney E, Sekedat M, Long S, Kelman Z, Jeruzalmi D (2009) A biochemically active MCM-like helicase in *Bacillus cereus*. *Nucleic Acids Res* **37**: 4441-4452

Sato M, Gotow T, You Z, Komamura-Kohno Y, Uchiyama Y, Yabuta N, Nojima H, Ishimi Y (2000) Electron microscopic observation and single-stranded DNA binding activity of the Mcm4,6,7 complex. *J Mol Biol* **300**: 421-431

Sclafani RA, Holzen TM (2007) Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet* **41**: 237-280

Schwacha A, Bell SP (2001) Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication. *Mol Cell* **8**: 1093-1104

Sheaff RJ, Kuchta RD, Ilsley D (1994) Calf thymus DNA polymerase alpha-primase: "communication" and primer-template movement between the two active sites. *Biochemistry* **33**: 2247-2254

Shin JH, Jiang Y, Grabowski B, Hurwitz J, Kelman Z (2003) Substrate requirements for duplex DNA translocation by the eukaryal and archaeal minichromosome maintenance helicases. *J Biol Chem* **278**: 49053-49062

Shin JH, Kelman Z (2006) The replicative helicases of bacteria, archaea, and eukarya can unwind RNA-DNA hybrid substrates. *J Biol Chem* **281**: 26914-26921

Sorzano CO, Marabini R, Velazquez-Muriel J, Bilbao-Castro JR, Scheres SH, Carazo JM, Pascual-Montano A (2004) XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol* **148**: 194-204

Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**: 207-234

Takahashi TS, Wigley DB, Walter JC (2005) Pumps, paradoxes and ploughshares: mechanism of the MCM2-7 DNA helicase. *Trends Biochem Sci* **30**: 437-444



Takeda DY, Dutta A (2005) DNA replication and progression through S phase. *Oncogene* **24**: 2827-2843

Toth EA, Li Y, Sawaya MR, Cheng Y, Ellenberger T (2003) The crystal structure of the bifunctional primase-helicase of bacteriophage T7. *Mol Cell* **12**: 1113-1123

Tougu K, Peng H, Marians KJ (1994) Identification of a domain of Escherichia coli primase required for functional interaction with the DnaB helicase at the replication fork. *J Biol Chem* **269**: 4675-4682

Tuteja N, Tuteja R (2004) Prokaryotic and eukaryotic DNA helicases. Essential molecular motor proteins for cellular machinery. *Eur J Biochem* **271**: 1835-1848

Tye BK (1999) MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **68**: 649-686

Tye BK (2000) Insights into DNA replication from the third domain of life. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2399-2401

VanLoock MS, Alexandrov A, Yu X, Cozzarelli NR, Egelman EH (2002) SV40 large T antigen hexamer structure: domain organization and DNA-induced conformational changes. *Curr Biol* **12**: 472-476

VanLoock MS, Chen YJ, Yu X, Patel SS, Egelman EH (2001) The primase active site is on the outside of the hexameric bacteriophage T7 gene 4 helicase-primase ring. *J Mol Biol* **311**: 951-956

Waga S, Stillman B (1994) Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature* **369**: 207-212

Waga S, Stillman B (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **67**: 721-751

Watson JD, Crick FH (1953) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **171**: 964-967

Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5088-5090

Wu CA, Zechner EL, Marians KJ (1992) Coordinated leading- and lagging-strand synthesis at the Escherichia coli DNA replication fork. I. Multiple effectors act to modulate Okazaki fragment size. *J Biol Chem* **267**: 4030-4044



Yang S, Yu X, VanLoock MS, Jezewska MJ, Bujalowski W, Egelman EH (2002) Flexibility of the rings: structural asymmetry in the DnaB hexameric helicase. *J Mol Biol* **321**: 839-849

Yang XM, Richardson CC (1997) Amino acid changes in a unique sequence of bacteriophage T7 DNA polymerase alter the processivity of nucleotide polymerization. *J Biol Chem* **272**: 6599-6606

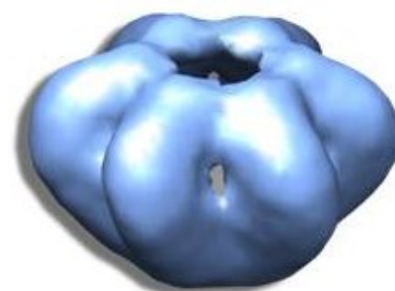
Yardimci H, Loveland AB, Habuchi S, van Oijen AM, Walter JC (2010) Uncoupling of sister replisomes during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* **40**: 834-840

Yoda K, Okazaki T (1991) Specificity of recognition sequence for Escherichia coli primase. *Mol Gen Genet* **227**: 1-8

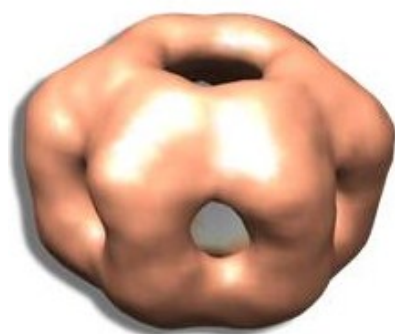
Yu X, VanLoock MS, Poplawski A, Kelman Z, Xiang T, Tye BK, Egelman EH (2002) The Methanobacterium thermoautotrophicum MCM protein can form heptameric rings. *EMBO Rep* **3**: 792-797

Zlotkin T, Kaufmann G, Jiang Y, Lee MY, Uitto L, Syvaoja J, Dornreiter I, Fanning E, Nethanel T (1996) DNA polymerase epsilon may be dispensable for SV40- but not cellular-DNA replication. *EMBO J* **15**: 2298-2305





Apéndice



Manuscritos enviados del autor de la presente memoria de tesis doctoral:

- **June Sanchez¹**, Pablo Mesa¹, Arkaitz Ibarra², Juan Mendez², Jasminka Boskovic^{1*} and Guillermo Montoya^{1*}(2011) Molecular architecture of a MCM helicase-primase complex. Enviado para su publicación a *EMBO JOURNAL*.

¹Structural Biology and Biocomputing Programme, Macromolecular Crystallography Group, ²Molecular Oncology Programme, DNA Replication Group, Spanish National Cancer Center (CNIO), c/Melchor Fdez. Almagro 3, 28029-Madrid, Spain

*Autores de contacto (“Shared Corresponding Author”).

